



**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2011**

Departamento de Química

**Fábio Pedro Almeida  
Gomes**

**Biossíntese de Celulose Bacteriana a partir  
de Resíduos Industriais**





**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2011**

Departamento de Química

**Fábio Pedro Almeida  
Gomes**

**Biossíntese de Celulose Bacteriana a partir  
de Resíduos Industriais**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob orientação da Dr.<sup>a</sup> Luísa Serafim, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação da Dr.<sup>a</sup> Cármen Freire, Investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.





## **o júri**

presidente

Professor Doutor João Manuela da Costa e Araújo Pereira Coutinho  
Professor associado com agregação na Universidade de Aveiro

Doutora Maria Filomena Andrade de Freitas  
Investigadora Pós-Doutoramente Universidade Nova de Lisboa

Professora Doutora Luísa Seuanes Serafim Leal  
Professora auxiliar convidada da Universidade de Aveiro

Doutora Cármen Sofia da Rocha Freire  
Investigadora CICEO na Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

Gostaria de Agradecer especialmente às minhas orientadoras, Professora Doutora Luísa Serafim e Doutora Cármen Freire pelo apoio, orientação e conhecimentos transmitidos ao longo do trabalho

À Doutora Eliane Trovatti pelo apoio fundamental na realização deste trabalho bem como conhecimento transmitido

Ao CEBAL e OCASUL pela cedência dos resíduos da produção do azeite bem como da cedência de informação sobre a sua caracterização

Ao aluno de Doutoramento Aleksey Lisenkov pela caracterização do material por SEM

Ao Doutor Daniel Fernandes pela ajuda com o funcionamento do HPLC

Ao Doutor Juan José Villaverde pela ajuda com o planeamento experimental

Aos colegas de todo o grupo de investigação de Materiais Macromoleculares e Lenhocelulósicos especialmente aqueles que partilharam o laboratório comigo

A todos os meus amigos em especial Jorge Carneiro, Ana Caetano, Eliane Trovatti, Daniel Fernandes, Carina Carvalho, pelo seu vasto apoio e amizade incondicional

Às pessoas mais importantes da minha vida, a minha Mãe, o meu Pai, o meu irmão, o meu Avô e a minha Tia pela força dada e por contribuírem para aquilo que sou hoje





**palavras-chave** Celulose Bacteriana, *Gluconacetobacter sacchari*, Resíduos Industriais, Borrás de Café, Resíduo da produção Azeite

## **resumo**

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero que devido às suas propriedades estruturais e mecânicas tem uma vasta gama de aplicações em diferentes áreas. Este biopolímero pode ser produzido por algumas bactérias, nomeadamente as pertencentes ao género *Gluconacetobacter*. No entanto, devido ao custo do meio de cultura a produção de CB a nível industrial tem pouca viabilidade económica.

O trabalho realizado teve como objectivo a utilização de diferentes resíduos da Indústria Agro-Alimentar para a produção de CB utilizando a bactéria *Gluconacetobacter sacchari* de modo a baixar os custos de produção e, consequentemente, o preço final do produto. Foram utilizados resíduos provenientes da indústria portuguesa, nomeadamente da produção de azeite e a borra de café. Cada resíduo foi submetido a duas extracções aquosas a 40 e 100°C e uma hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M a 100°C de modo a obter substratos ricos em açúcares. A maior produção de CB foi obtida com o resíduo da produção de azeite após extracção a 40°C, 0.81 g/L e após extracção 100°C, 1.12 g/L, sem qualquer adição de nutrientes após 96h de cultura.

De modo a otimizar a produção, realizaram-se testes com os extractos dos resíduos referidos que foram suplementados com fontes de azoto e fósforo de modo a ultrapassar eventuais limitações nutricionais, utilizando um planeamento experimental. Verificou-se que a adição das referidas fontes é benéfico para a produção atingindo valores entre 1g/L e 1.6 g/L. De qualquer modo apesar de uma melhoria na produção de CB as diferentes concentrações fornecidas aos microrganismos não são muito relevantes na produção.

As amostras de CB obtidas nos diferentes ensaios foram caracterizadas por FTIR e SEM, verificando-se que se trata de celulose tipo I, bem como se confirma a estrutura tridimensional da CB.



**keywords**

Bacterial Cellulose, *Gluconacetobacter sacchari*, Industrial Residues, Spent Coffee grounds, olive residue

**abstract**

Bacterial Cellulose (BC) is a biopolymer that bears unique mechanical and structural properties resulting in many applications in different areas. This biopolymer can be produced by many bacteria specially those belonging to the *Gluconacetobacter* genus. However, due to the high cost of the culture medium, production of BC has low economic viability at industrial level.

The purpose of this work was to evaluate the possibility of utilization of different residues from the food industry to produce BC by *Gluconacetobacter sacchari* in order to decrease the production costs and, consequently, the final cost of the product.

A residue from the olive oil production industry and spent coffee grounds were evaluated as possible sources of substrate for BC production. Each residue was submitted to two aqueous extractions at 40 and 100 °C and a hydrolysis step with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M in order to obtain a substrate rich in sugars.

The highest amounts of BC produced were obtained with the olive oil residue extract obtained at 40 °C, 0.81 g/L, and at 100 °C, 1.12 g/L without addition of any type of nutrients after 96 hours of operation.

In order to enhance the production of BC, the residues were supplemented with nitrogen and phosphate sources to overcome possible nutritional limitations, using a experimental design. It was verified that the addition of the nutrients was beneficial to the production, reaching values between 1 and 1.6 g/L. Despite the improvement on the amount of BC produced, different combinations of the concentrations supplied to the microorganisms did not influence significantly the production.

Samples of BC obtained on the different trials performed were characterized by FTIR and SEM. These techniques confirmed that the membranes had a cellulose type I structure as well as the tridimensional network of BC.



# ÍNDICE

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Índice.....</b>                                       | <b>xi</b>   |
| <b>Índice de figuras .....</b>                           | <b>xiv</b>  |
| <b>Índice de tabelas .....</b>                           | <b>xvii</b> |
| <b>Nomenclatura .....</b>                                | <b>xix</b>  |
| <b>1. Introdução.....</b>                                | <b>1</b>    |
| <b>2. Revisão Bibliográfica .....</b>                    | <b>3</b>    |
| 2.1. Celulose Vegetal.....                               | 3           |
| 2.2. Celulose Bacteriana .....                           | 6           |
| 2.2.1. Aplicações .....                                  | 9           |
| 2.2.1.1. Alimentação.....                                | 9           |
| 2.2.1.2. Medicina e farmácia.....                        | 10          |
| 2.2.1.3. Outras aplicações .....                         | 11          |
| 2.3. Biossíntese.....                                    | 12          |
| 2.3.1. Síntese do Precursor: UDPGlc .....                | 13          |
| 2.3.2. Mecanismo de Polimerização.....                   | 14          |
| 2.4. Condições operacionais para a produção .....        | 16          |
| 2.5. Produção de CB a partir de substratos baratos ..... | 17          |
| 2.5.1. Substratos testados em trabalhos anteriores ..... | 17          |
| 2.5.2. Substratos a testar no presente trabalho .....    | 20          |
| 2.5.2.1. Resíduos de Azeitona.....                       | 20          |
| 2.5.2.2. Borra de Café.....                              | 21          |
| 2.6. Planeamento de experiências.....                    | 23          |
| <b>3. Materiais e Métodos.....</b>                       | <b>25</b>   |
| 3.1. Microrganismo.....                                  | 25          |
| 3.2. Meio de cultura.....                                | 25          |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| 3.3.       | Resíduos .....  | 25 |
| 3.3.1.     | Resíduos da Azeitona.....   | 25 |
| 3.3.2.     | Borras de Café .....  | 25 |
| 3.3.3.     | Tratamento dos resíduos .....   | 26 |
| 3.4.       | Ensaio de produção de CB.....   | 26 |
| 3.4.1.     | Inóculo .....   | 26 |
| 3.4.2.     | Ensaio para produção de CB Amostragem.....  | 27 |
| 3.4.2.1.   | Seleção Resíduos da azeitona .....  | 27 |
| 3.4.2.2.   | Estudo necessidade adição de sais .....   | 27 |
| 3.4.2.2.1. | Resíduo do bagaço líquido e extracto S 40 com adição de<br>sais                               | 27 |
| 3.4.2.2.2. | Planeamento experimental 96 horas.....  | 28 |
| 3.4.2.2.3. | Planeamento experimental 24 e 60 horas .....  | 29 |
| 3.4.2.3.   | Resíduo S com diferentes extracções.....  | 31 |
| 3.4.2.4.   | Borras .....  | 31 |
| 3.4.2.4.1. | Produção de CB utilizando resíduos Ba e Bd com<br>diferentes tipos de extracções.....         | 31 |
| 3.4.2.4.2. | Produção de BC utilizando os extractos dos resíduos Ba e<br>Bd com suplementação de sais..... | 32 |
| 3.5.       | Lavagem e purificação das membranas de CB.....  | 33 |
| 3.6.       | Quantificação Açúcares .....  | 34 |
| 3.6.1.     | Açúcares redutores.....   | 34 |
| 3.6.2.     | Quantificação dos açúcares por HPLC .....   | 34 |
| 3.7.       | Caracterização das membranas de CB .....  | 35 |
| 3.7.1.     | Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)<br>.....                      | 35 |
| 3.7.2.     | Microscopia Electrónica de Varredura (SEM).....   | 35 |
| 3.8.       | Desenho Experimental .....  | 35 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.9. Cálculos.....   | 36        |
| <b>4. Resultados e Discussão.....</b>  | <b>37</b> |
| 4.1. Ensaio com resíduos de azeitona.....  | 37        |
| 4.1.1. Selecção Resíduos .....   | 37        |
| 4.1.2. Ensaio com suplementação com fontes de azoto e fósforo .....                      | 38        |
| 4.1.3. Planeamento experimental: ensaios de 96h com sais .....                           | 39        |
| 4.1.4. Planeamentos experimentais de 24 e 60 horas .....                                 | 41        |
| 4.1.5. Produção de CB a partir do resíduo S após diferentes métodos de<br>extracção..... | 47        |
| 4.1.5.1. Caracterização dos extractos .....  | 47        |
| 4.1.5.2. Produção de CB a partir dos extractos .....                                     | 48        |
| 4.2. Ensaio com as borras de café.....   | 51        |
| 4.3. Caracterização das Mantas de CB .....   | 55        |
| 4.3.1. FTIR.....   | 55        |
| 4.3.2. SEM .....   | 56        |
| <b>5. Conclusões e trabalho futuro.....</b>  | <b>59</b> |
| <b>Referências.....</b>  | <b>61</b> |



# ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura molecular da celulose [6].  | 3  |
| Figura 2 – a) e b) representam as ligações intra e inter-moleculares na celulose [7].  | 4  |
| Figura 3 – Organização da parede celular fibrosa. A – fibras de celulose; B – macrofibrilas; C – microfibrilas; D – fibrilas elementares; E – molécula de celulose; F – células unitárias de celulose cristalina; G – celobiose [8].   | 5  |
| Figura 4 – Projecções axiais das estruturas de celulose I e de celulose II.  | 5  |
| Figura 5 – Organização microfibrilar de a) CB produzida por <i>G. xylinuse</i> b) pasta de madeira, ampliação 5000× imagens obtidas por SEM [12].  | 8  |
| Figura 6 – Membranas de CB em estado hidratado.  | 8  |
| Figura 7 – Membrana de CB seca.  | 9  |
| Figura 8 – Nata de coco.   | 9  |
| Figura 9 – Evolução processo cicatrização da pele com a aplicação de um curativo de um biomaterial baseado em CB. A e B aplicação ao fim de algumas horas e C ao fim de alguns dias.   | 11 |
| Figura 10 – Máscara de beleza de CB.   | 12 |
| Figura 11 – Princípios fundamentais na produção de CB por cultura à superfície [42].   | 13 |
| Figura 12 – Vias bioquímicas para a produção de celulose bacteriana por <i>G. xylinus</i> . 1- glucose permease; 2- glucocinase (ATP) (EC 2.7.1.2); 3-fosfoglucomutase (EC 5.3.1.9); 4-UDPGlcpirofosforilase (UTP) (EC 2.7.7.9); 5- celulose sintetase (EC 2.4.1.12); 6- fosfoglucoisomerase (EC 5.3.1.9); 7- glucose-6-fosfato desidrogenase (NADP) (EC 1.1.1.49); 8- transaldolase (EC 2.2.1.2); 9 - frutose difosfatase (EC 3.1.3.11); 10- aldolase (EC 4.1.2.13); 11- triosefosfato isomerase (5.3.1.1); 12- glicerol-3-fosfato desidrogenase (NAD) (EC 1.1.1.8); 12a- glicerol-3-fosfato desidrogenase (FAD); 13- glicerol desidroxiacetonquinase (ATP); 14- transcetolase (EC 2.2.1.1); 15- piruvatodescarboxilase (EC 4.1.1.1); 16- oxaloacetato desidrogenase (EC 4.1.1.3); P- fosfato; OAA- oxaloacetato [7]. | 14 |
| Figura 13 – Montagem das microfibrilas de CB pela <i>G. xylinus</i> [12].  | 15 |
| Figura 14 – Celulose bacteriana produzida em meio estático (a) e em meio agitado (b).  | 16 |
| Figura 15 – Esquema de Extração do azeite com formação bagaço da azeitona.   | 21 |
| Figura 16 – Utilização das Borrás de café na produção de compostos entre os quais biodiesel [65].  | 22 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 17 – Esquema de montagem da Extracção Soxhlet. ....   | 26 |
| Figura 18 – Ensaio Preliminar com os resíduos L, C e extracto S40.....   | 37 |
| Figura 19 – Resíduo L e extracto S 40 suplementados com fosfato de potássio e sulfato de amónia. ....                          | 38 |
| Figura 20 – Quantidades de CB produzidas durante os ensaios do planeamento experimental de 96 horas.....                       | 40 |
| Figura 21 – Quantidades de CB produzidas durante os ensaios do planeamento experimental de 24 horas.....                       | 42 |
| Figura 22 - Quantidades de CB produzidas durante os ensaios do planeamento experimental de 60 horas.....                       | 43 |
| Figura 23 – Evolução da quantidades de CB produzidas e de açúcares consumidos durante a produção CB com S 40. ....             | 45 |
| Figura 24 – Quantidades de CB produzidas a partir dos extractos do resíduo S obtidos por diferentes métodos de hidrólise. .... | 48 |
| Figura 25 – Formação de compostos tóxicos para a bactéria <i>G. sacchari</i> [73].....   | 50 |
| Figura 26 – Quantidades de CB produzidas a partir dos resíduos Ba e Bd.....  | 53 |
| Figura 27 – Espectros de FTIR obtidos para os Resíduos utilizados e meio referência HS. ....                                   | 55 |
| Figura 28 – Imagem de SEM produzida pelo extracto S 40 16.2mmx2.0K 20.0 um.....  | 56 |
| Figura 29 – Imagem de SEM do extracto S 40 16.2 mm x 10.0K 5 um.....   | 56 |
| Figura 30 – Imagem SEM do extracto S 40 16.2mm x 18.0K 3.00 um.....  | 57 |



# ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Características da CB e da CV [3].   | 7  |
| Tabela 2 – Composição química da borra de café [67].  | 23 |
| Tabela 3 – Caracterização das amostras do bagaço líquido e do extracto S 40 com suplementação de sais.  | 28 |
| Tabela 4 – Caracterização das amostras extracto S 40 planeamento experimental 96 horas.   | 29 |
| Tabela 5 – Caracterização das amostras planeamento experimental 24 horas  | 30 |
| Tabela 6 – Caracterização das amostras planeamento experimental 60 horas  | 30 |
| Tabela 7 – Caracterização das amostras da Evolução Produção de CB com o extracto S40 com o tempo  | 31 |
| Tabela 8 – Caracterização das amostras do extractos do resíduo S.   | 31 |
| Tabela 9 – Caracterização das amostras dos extractos dos resíduos Ba e Bd   | 32 |
| Tabela 10 – Caracterização das amostras dos extractos dos resíduos Ba e Bs com adição de sais   | 33 |
| Tabela 11 – Concentração de açúcares no final dos ensaios efectuados com residuo L e extracto S 40 suplementados com fosfato de potássio e sulfato de amónia. | 39 |
| Tabela 12 – Concentração de açúcares no final dos ensaios efectuados com residuo L e extracto S 40 suplementados com fosfato de potássio e sulfato de amónia. | 41 |
| Tabela 13 – Concentração de açúcares no final dos ensaios do planeamento de 24 horas.   | 43 |
| Tabela 14 – Concentração de açúcares e de CB no final dos ensaios do planeamento de 60 horas.   | 44 |
| Tabela 15 – Concentração de açúcares e de CB durante o ensaio de produção com S 40 sem sais.  | 45 |
| Tabela 16 – Concentração de açúcares presentes nos extractos obtidos a partir do resíduo S.   | 47 |
| Tabela 17 – Concentração de açúcares e de CB nos ensaios efectuados nos extractos.  | 51 |
| Tabela 18 – Produtividade e rendimento obtidos nos ensaios com os extractos S 40, S 100 e HS.   | 51 |
| Tabela 19 – Açúcares presentes nos extractos dos resíduos Ba e Bd.  | 52 |
| Tabela 20 – Concentração de açúcares e de CB no final dos ensaios com os resíduos Ba e Bd.  | 54 |



# NOMENCLATURA

|             |   |
|-------------|---|
| $\alpha$    | Grau de conversão de substrato %                            |
| Ba          | Resíduo sólido da borra antes da extracção do óleo          |
| Ba 40       | Extracto aquoso 40°C do resíduo Ba                          |
| Ba 100      | Extracto aquoso 100 °C do resíduo Ba                        |
| Ba H        | Hidrolisado 100°C do resíduo Ba                             |
| Bd          | Resíduo sólido da borra depois da extracção do óleo         |
| Bd 40       | Extracto aquoso 40 °C do resíduo Bd                         |
| Bd 100      | Extracto aquoso 100 °C do resíduo Bd                        |
| Bd H        | Hidrolisado 100°C do resíduo Bd                             |
| CB          | Celulose Bacteriana   |
| CV          | Celulose Vegetal  |
| CS          | Celulose Sintetase  |
| DNS         | Ácido 3,5 - Dinitrossalicílico                              |
| DP          | Grau de Polimerização                                       |
| FTIR        | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier |
| Glc – 6 – P | Glucose – 6 – Fosfato                                       |
| HPLC        | Cromatografia Líquida de Alta Performance                   |
| L           | Resíduo Líquido do Bagaço                                   |
| $\Gamma$ CB | Produtividade de Celulose Bacteriana (g/L.h)                |
| S           | Resíduo sólido Bagaço extractado                            |
| S 40        | Extracto aquoso 40 °C do resíduo S                          |
| S 100       | Extracto aquoso 100°C do resíduo S                          |
| SEM         | Microscopia Electrónica de Varrimento                       |
| Si          | Concentração inicial de substrato g/L                       |
| $\Delta$ S  | Variação de concentração de substrato (g/L)                 |
| $\Delta$ CB | Concentração de Celulose Bacteriana produzida g/L           |
| UDPGlc      | Uridina - difosfato - glucose                               |
| Y CB/S      | Rendimento de Celulose Bacteriana/Substrato g/g             |



# 1. INTRODUÇÃO

Actualmente, a nível mundial assiste-se na Sociedade a uma crescente preocupação ambiental devido à poluição causada pela utilização de derivados do petróleo. Além disso, o petróleo tem apresentado nos últimos tempos fortes oscilações de preço e as reservas naturais poderão extinguir-se dentro de alguns anos o que obriga a mudanças na estratégia e comportamento da sociedade actual. Uma das estratégias consiste na transição de uma economia baseada em recursos fósseis, para uma economia predominantemente baseada em materiais renováveis cujo processamento e utilização causem menos danos no ambiente e economizem mais energia.

Assim, nos últimos anos tem-se observado um crescimento do investimento e da investigação na utilização de materiais derivados de recursos renováveis de modo a promover a substituição dos materiais de origem petroquímica. Neste contexto, tem sido dada especial atenção a aos polímeros com origem em materiais renováveis. Entre os vários biopolímeros existentes, a celulose é um dos mais importantes e o mais abundante na Terra [1] . Existem diversas fontes de celulose além da vegetal: animal, bacteriana, química e enzimática [2, 3]. A celulose é o principal componente da parede celular das plantas e é normalmente obtida industrialmente a partir do processamento da madeira para a produção de pasta celulósica. Este tipo de celulose é designado de celulose vegetal (CV). A celulose também pode ser produzida por microrganismos como algas, fungos e bactérias, e neste caso designa-se por celulose bacteriana (CB), pois esta variedade observou-se pela primeira vez em bactérias. No entanto, os dois tipos de celulose apresentam diferentes características que se descrevem no capítulo seguinte, e que tornam a CB muito mais interessante em termos de aplicações, existindo, por isso, um elevado interesse das indústrias na CB. A principal desvantagem da CB em relação à celulose vegetal CV é o seu elevado custo de produção [4, 5].

Até agora a maior parte dos estudos publicados sobre a produção de CB utiliza a glucose como fonte de carbono e outros açúcares simples. No entanto, os microrganismos, principalmente os pertencentes ao género *Gluconacetobacter*, são capazes de utilizar vários substratos, como diferentes mono- ou dissacarídeos, álcoois ou ácidos dicarboxílicos, por exemplo [4].



Durante este trabalho experimental, conducente ao grau de Mestre, foram testados resíduos provenientes da indústria da produção de azeite (uma das principais a nível nacional), nomeadamente de uma unidade de produção de azeite, e correspondem ao resíduo de bagaço e ao resíduo bagaço seco extractado. Testou-se ainda a utilização da borra de café como substrato para a produção de CB. O objectivo é a valorização destes resíduos bem como a diminuição dos custos da produção de CB. Durante este trabalho foi estudada a necessidade de suplementação dos resíduos com nutrientes essenciais, como as fontes de azoto e fósforo. As combinações das concentrações destes dois nutrientes (N e P) foram definidas através de um planeamento experimental, que possibilitou variar diversos factores ao mesmo tempo, obtendo-se estimativas quantitativas dos vários efeitos e como os factores interagem entre si, de modo a otimizar o processo ao nível económico.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CELULOSE VEGETAL

A celulose é o principal constituinte da biomassa vegetal, representando cerca de  $1.5 \times 10^{12}$  toneladas do total de biomassa produzida anualmente a nível mundial [2]. Grande parte da biossíntese da celulose ocorre na parede celular das plantas, surgindo associada à lenhina, hemiceluloses e outros componentes [2]. A celulose é um polissacarídeo linear cuja fórmula química é  $(C_6H_{10}O_5)_n$  e é formado por unidades de D-glucopiranoose unidas por ligações  $\beta(1-4)$  [2]. A celobiose é a unidade básica de repetição da cadeia de celulose e consiste em duas unidades de glucose anidra (Figura 1), em que uma unidade se encontra em ângulo de  $180^\circ$  em relação ao plano [6].

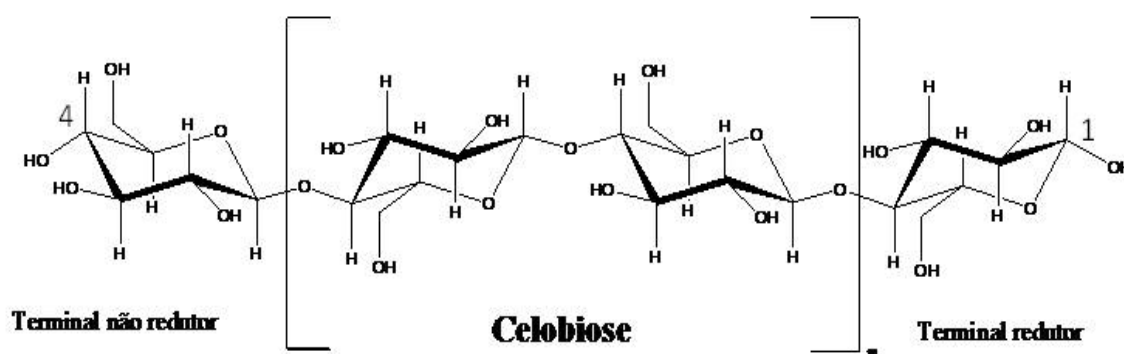


Figura 1 - Estrutura molecular da celulose [6].

O grau de polimerização (DP) da CV pode atingir as 20000 unidades de  $\beta$ -D-glucopiranoose, resultando num peso molecular bastante elevado, na ordem dos  $10^6$  ou superior. A celulose possui um baixo carácter redutor, devido a possuir uma única unidade de  $\beta$ -D-glucopiranoose com propriedades redutoras: a extremidade que termina com um grupo OH no carbono 1, que se encontra em equilíbrio com o aldeído correspondente (Figura 2). A extremidade não redutora termina com um grupo hidroxilo no carbono 4, do tipo álcool [2]. A CV apresenta propriedades como hidrofiliidade, degradabilidade, quiralidade e uma elevada reactividade química que está essencialmente associada à presença de grupos hidroxilo. A geometria espacial deste arranjo linear de monómeros de  $\beta$ -D-glucopiranoose ligados de forma covalente, dá

origem a estruturas fibrilares extensas, com todos os grupos hidroxilo livres a participarem em ligações de hidrogénio intra ( $O3-H...O5'$  e  $O6...H-O2'$ ) e inter-moleculares ( $O6-H...O3$ ) [6] (Figura 2). Desta forma agregados de várias cadeias de celulose formam camadas estabilizadas por forças de *Van der Waals* [2, 7].

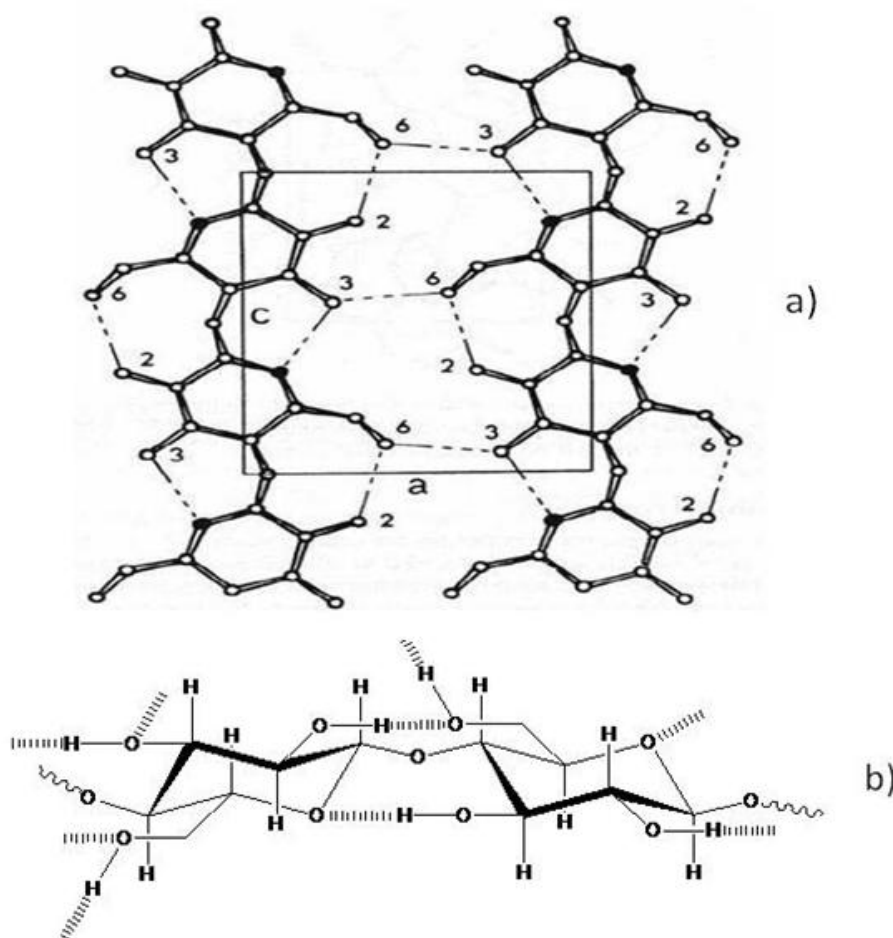
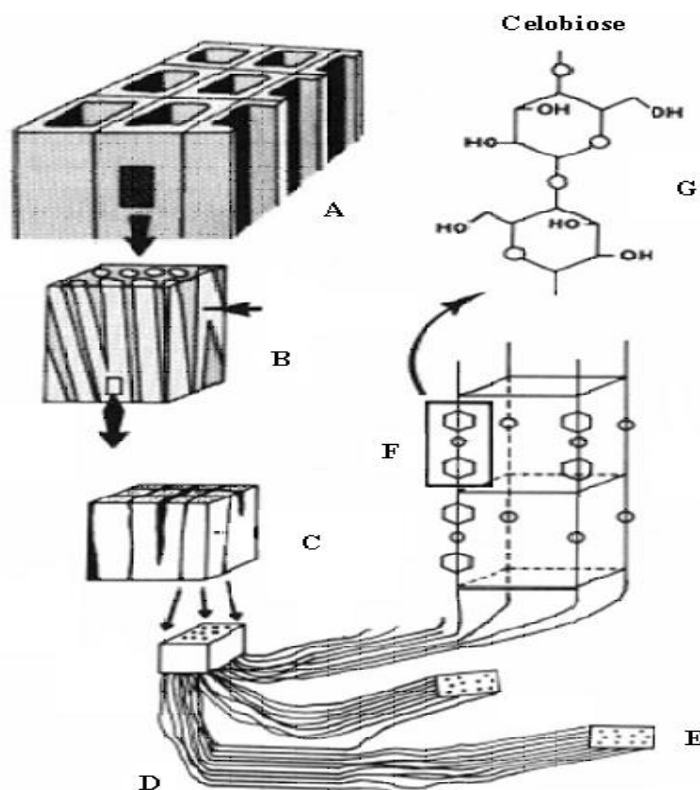


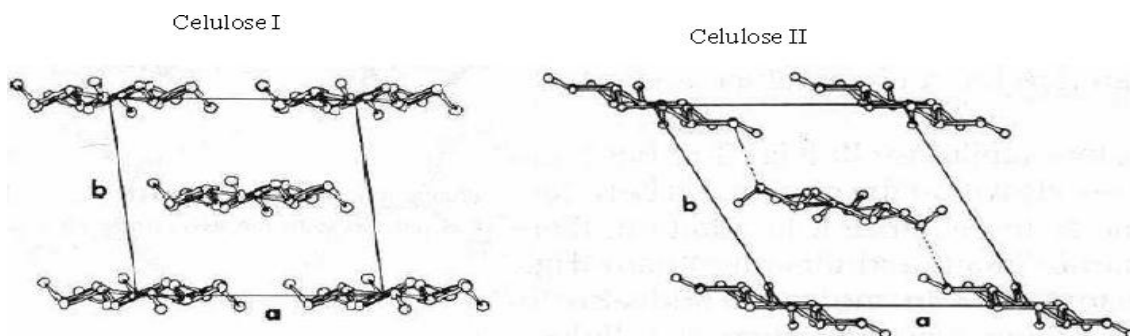
Figura 2 – a) e b) representam as ligações intra e inter-moleculares na celulose [7].

A Figura 3 descreve a organização da parede celular fibrosa. As fibrilas elementares, representadas em D são constituídas por regiões amorfas intercaladas com regiões cristalinas, que se associam dando origem a microfibrilas (C). Estas, por sua vez, originam macrofibrilas (B) que são precursoras das fibras de celulose representadas em A. Na figura também estão representadas moléculas de celulose (E), células unitárias de celulose cristalina (F) e uma unidade de celobiose (G).



**Figura 3 – Organização da parede celular fibrosa. A – fibras de celulose; B – macrofibrilas; C – microfibrilas; D – fibrilas elementares; E – molécula de celulose; F – células unitárias de celulose cristalina; G – celobiose [8].**

Na estrutura cristalina da celulose nativa (celulose I), as cadeias encontram-se dispostas de forma paralela (Figura 4). A celulose pode ainda existir noutras formas cristalinas, nomeadamente celulose II, III e IV, das quais a celulose II é a estrutura mais estável. Na celulose II as cadeias são anti-paralelas, sendo mais estável que a celulose I pois possui uma ligação adicional por cada resíduo de glucose (Figura 4). A celulose I é a forma mais abundante, sendo a celulose II uma forma rara que apenas se encontra em algumas espécies de algas e bactérias ou pode ser obtida a partir da celulose I após tratamento químico [9].



**Figura 4 – Projeções axiais das estruturas de celulose I e de celulose II.**

A pasta celulósica produzida a partir da madeira é maioritariamente utilizada na produção de papel e papelão. No entanto, cerca de 2% são usados na produção de fibras de celulose regenerada e de filmes, bem como na produção de derivados esteres e éteres de celulose, como por exemplo o nitrato de celulose ou a carboximetilcelulose (aproximadamente 3.2 milhões de toneladas em 2003 [2]). Estes derivados da celulose têm um número elevado de aplicações em várias áreas, sendo usados em revestimentos, laminados, filmes ópticos, como aditivos de materiais de construção, na indústria farmacêutica, alimentar ou cosmética [2]. Mais recentemente têm surgido novas aplicações para a celulose, devido à sua biocompatibilidade e quiralidade para a imobilização de proteínas, anticorpos e heparina, separação de moléculas enantioméricas, bem como para a produção de materiais compósitos com polímeros sintéticos e biopolímeros [2].

## **2.2. CELULOSE BACTERIANA**

A celulose bacteriana (CB) foi descrita pela primeira vez em 1886, por A.J. Brown [10]. Brown observou que alguns microrganismos utilizados para produção de ácido acético eram capazes de produzir uma membrana na superfície do meio de cultura na presença de glucose e de oxigénio e denominou-os como *Bacterium xylinum* [10]. Esta espécie, pertencente à família *Acetobacteriaceae*, foi, entretanto reclassificada taxonomicamente diversas vezes até à designação actual de *Gluconacetobacter xylinus*, embora muitas vezes seja ainda conhecida pela designação anterior de *Acetobacter xylinum* [11]. A espécie *G. xylinus* apresenta morfologia de bastonetes rectos ou ligeiramente curvos, alongados com um tamanho que varia entre  $0.6\text{-}0.8 \times 1.0\text{-}4.0 \mu\text{m}$ , apresentando ou não mobilidade. Estes microrganismos são tolerantes a condições ácidas, Gram-negativos, estritamente aeróbios, não fotossintéticos, com uma temperatura óptima de crescimento entre os 15 e os 34°C, ocorrendo a sua morte térmica entre os 65 e os 70 °C [2]. *G. xylinus* pode ser encontrada na superfície de frutas e vegetais em decomposição, no vinagre ou em bebidas alcoólicas [11]. Estas bactérias produzem quantidades consideráveis de CB a partir de diferentes fontes de carbono e de azoto complexas [12]. Entre os microrganismos pertencentes ao género *Gluconacetobacter* destacam-se ainda como produtores de CB as espécies *G. xylinus* [13], *G. hansenii* [14], *G. pasteurianus* [15] e *G. sacchari* [16]. Além destas, verificou-

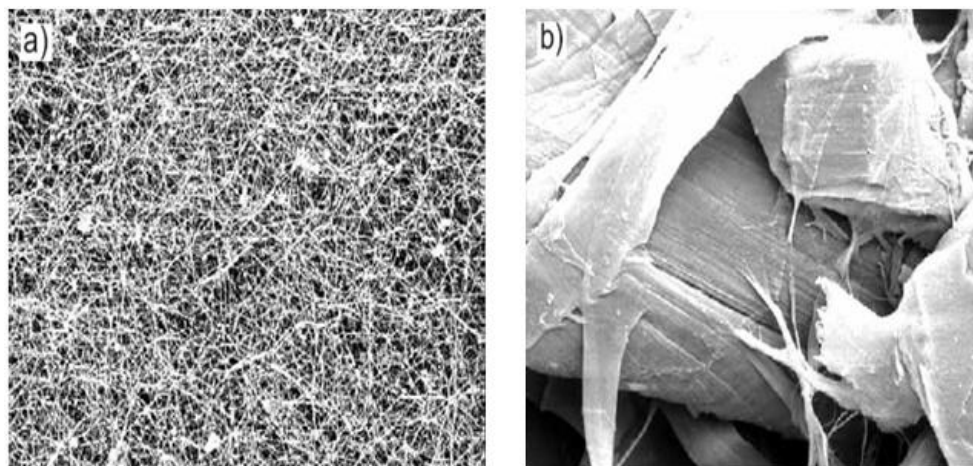
se que os géneros *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Alcaligenesi*, também produziam CB [12].

Na Tabela 1 comparam-se algumas características da CB e da CV. A estrutura química da CB é semelhante à da celulose vegetal  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , no entanto apresenta propriedades físicas e mecânicas distintas. A CB tem um grau de pureza maior (devido a não estar associada a hemiceluloses e lenhina), um índice de cristalinidade mais elevado, uma força de tensão mais elevada, maior capacidade de absorção e de retenção de água, elevada elasticidade e maior adaptabilidade biológica [12, 17, 18].

**Tabela 1 – Características da CB e da CV [3].**

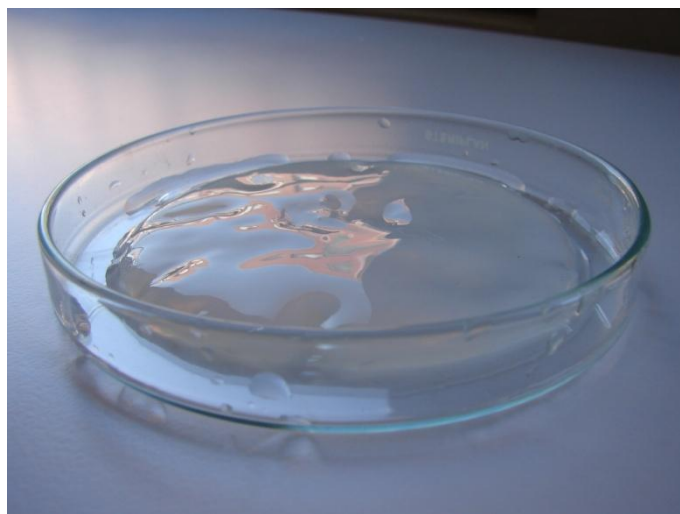
| <b>Características</b>                               | <b>CB</b>   | <b>CV</b>     |
|--|-------------|---------------|
| <b>Largura das fibras (<math>\mu\text{m}</math>)</b> | 0.07-0.13   | 30-75         |
| <b>Cristalinidade (%)</b>                            | 65-79       | 55-65         |
| <b>Grau de Polimerização</b>                         | 2000 – 6000 | 13000 – 14000 |
| <b>Módulo de Young (GPa)</b>                         | 15 – 30     | 5.5 – 12.6    |
| <b>Água (%)</b>                                      | 98.5        | 60            |

No início da produção, as cadeias de CB agregam-se formando sub-fibrilas com uma largura de aproximadamente de 1.5 nm. Estas sub-fibrilas agrupam-se com outras 36 sub-fibrilas semelhantes, originando uma fibrila elementar, com um diâmetro de aproximadamente 3.5 nm. Cerca de 46 fibrilas adjacentes juntam-se através de pontes de hidrogénio formando um ribbon, que é o nome dado às fibras de CB [3]. As dimensões destes ribbons variam consoante diferentes trabalhos estando compreendidas entre 0.003-0.004 (espessura)  $\times$  0.07-0.13  $\mu\text{m}$  (largura) [9, 19, 20], enquanto a largura das fibras de celulose produzidas através da madeira de bétula ou de pinho é 14-40 e 30-75  $\mu\text{m}$  [21], esta diferença pode ser observada na Figura 5 onde se apresentam as imagens obtidas por SEM para a CB e a CV. Estes *ribbons* ultra finos que atingem comprimentos que variam entre 1 e 9  $\mu\text{m}$  formam uma estrutura reticulada densa, que é estabilizada por pontes de hidrogénio [21]. O índice de cristalinidade da CB é superior ao da CV, o DP é normalmente entre 2000-6000 [22], podendo em alguns casos atingir os 16000 ou 20000 [20], sendo que o DP médio da CV varia entre 13000 e 14000 [21-23].



**Figura 5 – Organização microfibrilar de a) CB produzida por *G. xylinuse* b) pasta de madeira, ampliação 5000× imagens obtidas por SEM [12].**

A CB é produzida sob a forma de membrana gelatinosa (Figura 6), composta por 99 % de água, e quando seca assemelha-se a uma folha de papel translúcido com ligeiro brilho superficial [24]. Na Figura 7 apresenta-se uma membrana de CB seca.



**Figura 6 – Membranas de CB em estado hidratado.**

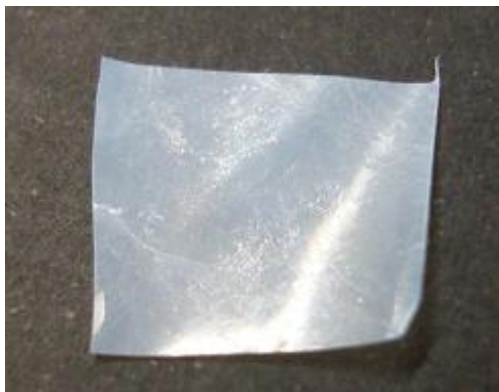


Figura 7 – Membrana de CB seca.

### 2.2.1. Aplicações

Devido às suas propriedades únicas, a CB pode ser utilizada numa gama mais vasta de aplicações que a celulose vegetal, em áreas como as indústrias têxtil, papelreira, alimentar, farmacêutica ou electrónica e no tratamento de resíduos [25-27].

#### 2.2.1.1. *Alimentação*

Uma das aplicações da CB mais antigas é na alimentação como sobremesa, com a designação de nata de coco (Figura 8) obtida a partir da água ou leite de coco no sudeste asiático [12, 28].



Figura 8 – Nata de coco.



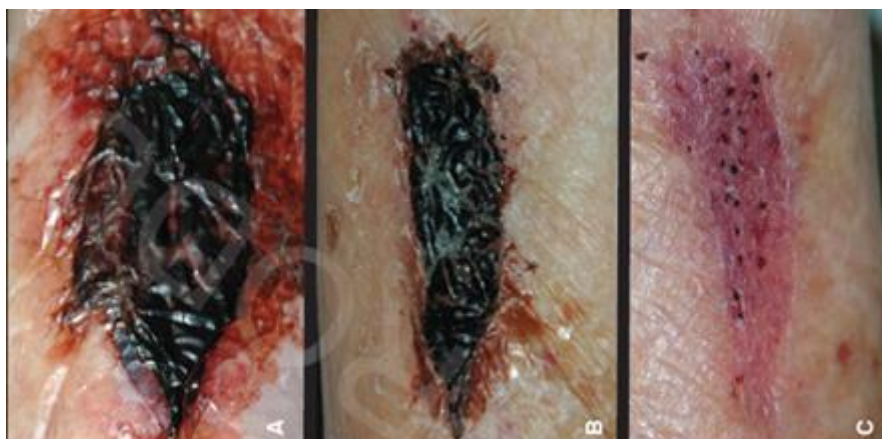
A CB pura pode ser utilizada como agente espessante e estabilizador no processamento de alimentos. Tendo propriedades semelhantes a de um gel e não sendo digerida no tracto intestinal humano tornam a nata de coco uma base alimentar interessante [28]. Nos anos 70, um metabolito de *Monascus* sp., a monacolina K, foi identificado como inibidor da síntese de colesterol. O complexo Monascus-nata de coco, que combina as características funcionais da monacolina K e da CB, foi descrito como podendo ser um alimento funcional [29, 30] .

Em 1992, a CB foi introduzida em bebidas dietéticas no Japão. Bactérias produtoras do género *Gluconacetobacter* cultivadas juntamente com leveduras em extractos de chá e açúcar. Esta bebida designada por chá Kombuchaé considerada benéfica para a saúde [12].

#### **2.2.1.2. Medicina e farmácia**

A CB tem uma elevada força de tensão, elevada porosidade e possui uma estrutura microfibrilar. Estas características permitem que a CB seja utilizada na área biomédica, especialmente em medicina regenerativa [12]. Os ferimentos crónicos como úlceras venosas ou diabéticas são difíceis de curar, representando um importante desafio clínico tanto para os pacientes como para os profissionais [12]. O tratamento de ferimentos crónicos envolve a aplicação de vários materiais (hidrocoloides, hidrogeis, membranas biológicas ou sintéticas) que proporcionam um ambiente curativo húmido, necessário para uma cura ideal. De acordo com as abordagens modernas no campo dos curativos, um sistema curativo ideal deve comportar-se como pele artificial, tanto a nível estrutural como funcional [12]. Os materiais curativos modernos devem ser não-tóxicos, não-pirógenicos e biocompatíveis, ter a capacidade de funcionar como barreira contra a infecções, controlar a perda de fluidos, reduzir a dor durante o tratamento, criar e manter um ambiente húmido na ferida, absorver exudados durante a fase inflamatória, exibir força mecânica elevada, elasticidade, conformabilidade, óptima forma e área de superfície [12]. Devido à CB ser um material altamente poroso como pele artificial permite a transferência de antibióticos e outros medicamentos para ferida servindo, ao mesmo tempo, como barreira física eficiente contra qualquer tipo de infecção externa [12].

A CB pode ser utilizada como pele artificial temporária no curativo de feridas e queimaduras [12, 22]; implantes dentários [31]; enxertos vasculares [31]; membranas de diálise [31]; revestimento de *stents* (endopróteses expansíveis) cardiovasculares e cranianos [31]; membranas para regeneração de tecidos [12]; substituição de tecidos; transportador de fármacos de libertação controlada [12, 31]; próteses vasculares [32] ou como vasos sanguíneos artificiais [33, 34]. A CB microporosa pode ter potencial como *scaffold* para regeneração óssea [35]. Outra aplicação nesta área pode ser a sua utilização sob a forma de curativos com acção antimicrobiana [36].



**Figura 9 – Evolução processo cicatrização da pele com a aplicação de um curativo de um biomaterial baseado em CB. A e B aplicação ao fim de algumas horas e C ao fim de alguns dias.**

#### 2.2.1.3. *Outras aplicações*

Para além das áreas alimentar e biomédica, a CB pode ser aplicada em outros campos, como na indústria papeleira, como material de reforço para o papel, aumentando a resistência e protegendo a sua superfície [37], na indústria da comunicação, na produção de diafragmas electroacústicos para auriculares (comercializado pela SONY) [12, 22] e ainda na área dos cosméticos como suporte de máscaras de beleza (Figura 10).

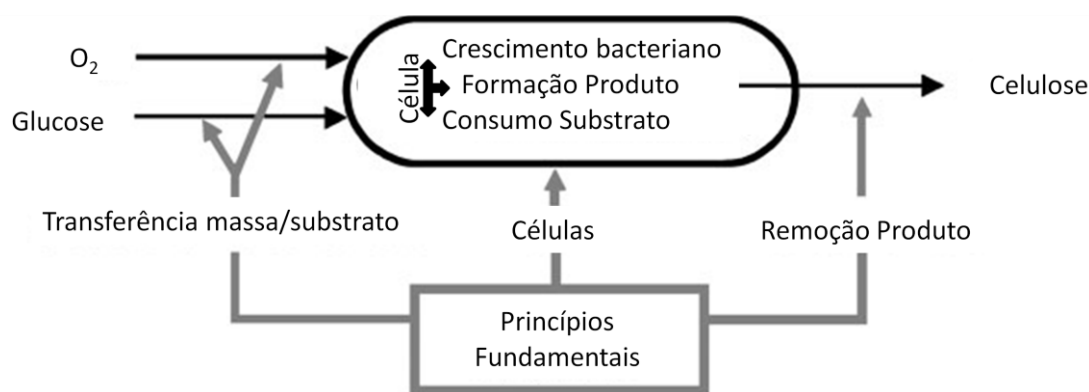


Figura 10 – Máscara de beleza de CB.

A CB foi ainda testada como suporte para a imobilização de enzimas [38] ou na produção de compósitos por exemplo com hidroxiapatita (aplicações biomédicas) [39] com *aloé vera* [40], resultando um biofilme reforçado com elevada força mecânica, cristalinidade capacidade absorção de água e permeabilidade ao vapor de água e também com resinas acrílicas com claras melhorias nas propriedades mecânicas e térmicas quando comparado com o filme de CB sem modificação [41].

### 2.3. BIOSÍNTESE

A produção de celulose em microrganismos do género *Gluconacetobacter* está associada ao crescimento e consome cerca de 10% da energia gerada nas reacções catabólicas embora não interfira nos processos anabólicos que ocorrem no meio intracelular [7, 21] (Figura 11).



**Figura 11 – Princípios fundamentais na produção de CB por cultura à superfície [42].**

A biossíntese da celulose bacteriana é um processo que envolve vários passos especificamente regulados por um número elevado de enzimas e de complexos de proteínas reguladoras e catalíticas. O processo de biossíntese da CB está dividido em duas partes fundamentais. A primeira é a síntese do precursor da celulose, a uridinadifosfoglucose (UDPGlc) e a segunda parte está relacionada com os mecanismos de polimerização [7, 12].

### 2.3.1. Síntese do Precursor: UDPGlc

A utilização de determinado substrato para a produção de CB por *G. xylinus* pode ocorrer através de duas vias anfibólicas: a via das pentoses-fosfato para a oxidação de hidratos de carbono e o ciclo de Krebs para a oxidação de ácidos orgânicos e compostos relacionados [7]. Podem definir-se quatro passos enzimáticos principais (Figura 12), que expressam a via completa de conversão de glucose em CB [7], onde o precursor directo da celulose é a UDPGlc [7]:

- Fosforilação da glucose, originando a glucose-6-fosfato (Glc-6-P), pela glucocinase;
- Isomerização da Glc-6-P a glucose-1-fosfato, pela fosfoglucomutase;
- Conversão da Glc-1-P em UDPGlc, pela UDPGlcpirofosfatase.
- Conversão da UDPGlc em celulose pela enzima celulose sintetase [7].

Na Figura 12 estão representadas as vias bioquímicas para a produção de CB.

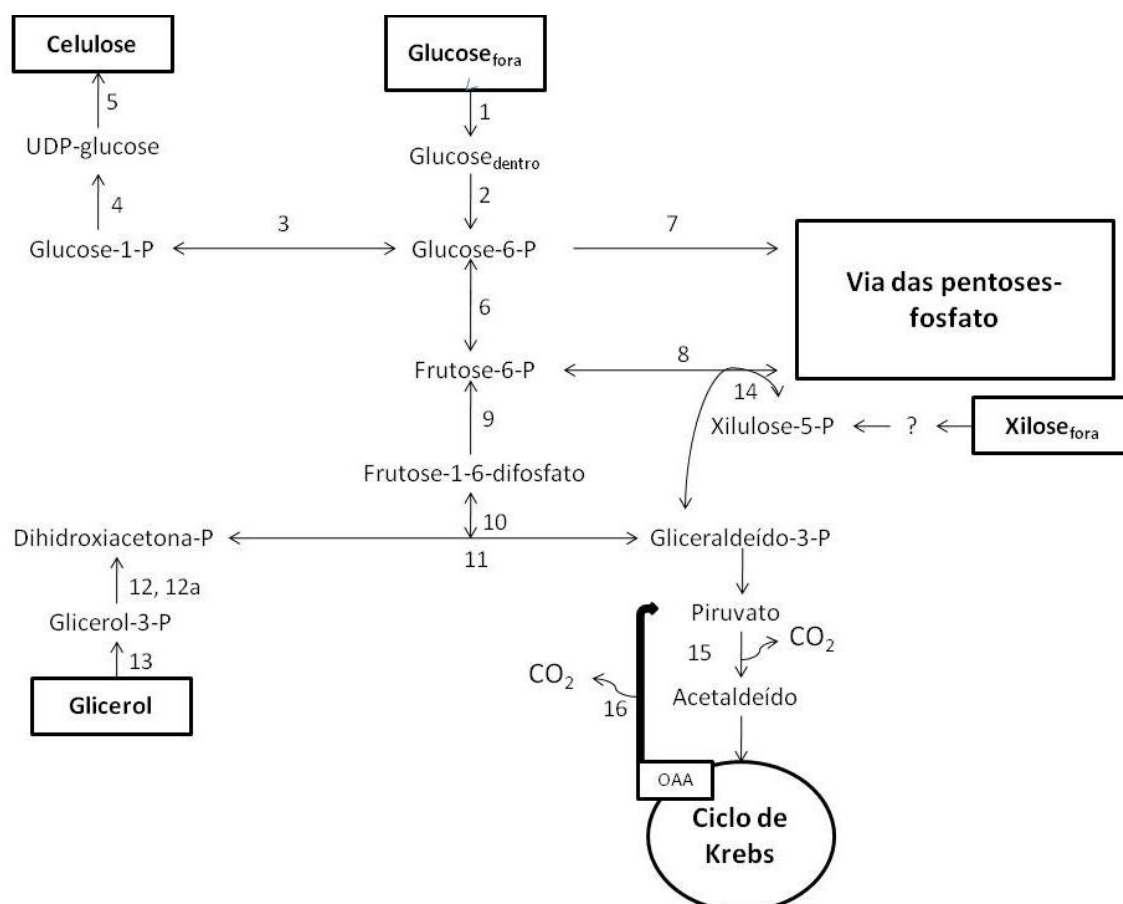


Figura 12 – Vias bioquímicas para a produção de celulose bacteriana por *G. xylinus*. 1- glucose permease; 2- glucocinase (ATP) (EC 2.7.1.2); 3- fosfoglucomutase (EC 5.3.1.9); 4- UDPGlcpirofosforilase (UTP) (EC 2.7.7.9); 5- celulose sintetase (EC 2.4.1.12); 6- fosfoglucoisomerase (EC 5.3.1.9); 7- glucose-6-fosfato desidrogenase (NADP) (EC 1.1.1.49); 8- transaldolase (EC 2.2.1.2); 9 - frutose difosfatase (EC 3.1.3.11); 10- aldolase (EC 4.1.2.13); 11- triosefosfato isomerase (5.3.1.1); 12- glicerol-3-fosfato desidrogenase (NAD) (EC 1.1.1.8); 12a- glicerol-3-fosfato desidrogenase (FAD); 13- glicerol desidroxiacetonaquinase (ATP); 14- transcetolase (EC 2.2.1.1); 15- piruvatodescarboxilase (EC 4.1.1.1); 16- oxaloacetato desidrogenase (EC 4.1.1.3); P- fosfato; OAA- oxaloacetato [7].

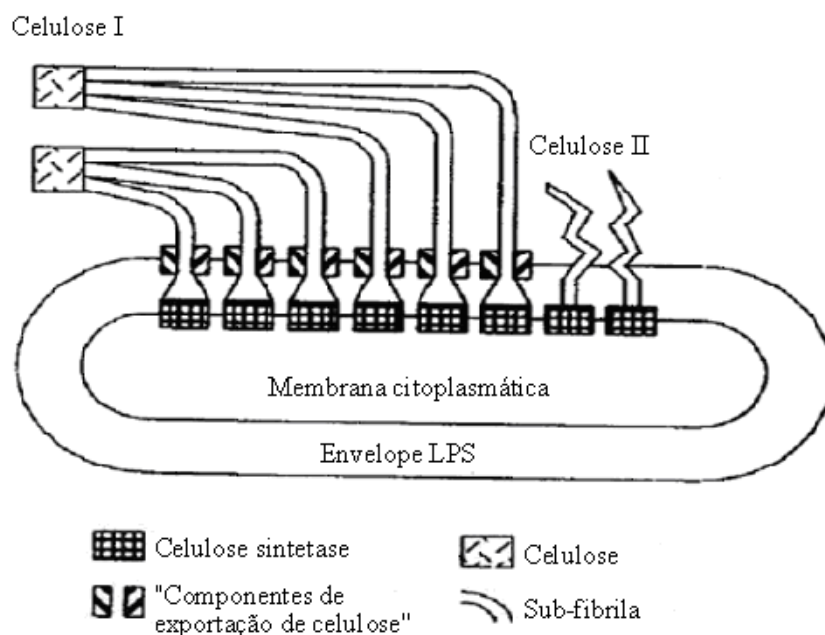
Os três passos finais de biossíntese de CB são idênticos para todas as fontes de carbono consideradas, que após serem convertidas em frutose-6-fosfato (intermediário comum à gluconeogênese e à via das pentoses-fosfato), seguem a via de síntese de celulose anteriormente mencionada.

### 2.3.2. Mecanismo de Polimerização

O processo de polimerização das unidades de UDPGlc é mediado pela enzima CS [7]. Esta enzima possui uma massa molecular de 400-500 KDa e aparece firmemente ligada à membrana citoplasmática, como se pode ver na Figura 13. A polimerização das unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosose é o primeiro passo na formação de

CB e é um processo associado à membrana celular, enquanto os restantes passos ocorrem no espaço imediatamente exterior à parede celular.

A CS catalisa a polimerização de unidades de UDPGlc em cadeias glicosídicas  $\beta(1-4)$ . A formação destas cadeias ocorre na membrana citoplasmática, como se pode ver na Figura 13. Os resíduos de glucose são adicionados no terminal não redutor, sendo o polímero nascente libertado da célula a partir do seu terminal redutor.

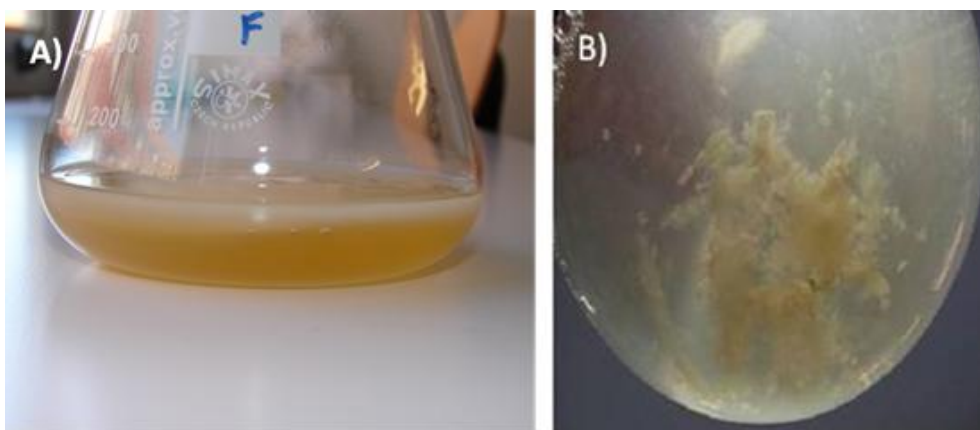


**Figura 13 – Montagem das microfibrilas de CB pela *G. xylinus* [12].**

Através de microscopia electrónica verificou-se a existência de 50 a 80 locais semelhantes a poros, dispostos numa linha regular ao longo do eixo da membrana lipopolissacarídica, existindo uma justaposição com os *ribbons* celulósicos extra celulares. Estes locais estão representados na figura como *componentes de exportação de celulose*. Presume-se que estas estruturas sejam locais de extrusão para os polímeros pré-celulósicos, em grupos de 10 a 15 cadeias glicosídicas  $\beta(1-4)$ . Considera-se que estes agregados sejam as formas iniciais do produto celulósico, em vez de cadeias individuais. Estas estruturas originam as fibrilas elementares, que por sua vez dão origem aos *ribbon* [7, 12].

## 2.4. CONDIÇÕES OPERACIONAIS PARA A PRODUÇÃO

A produção de CB está relacionada com a disponibilidade de oxigénio para os microrganismos. Se a sua disponibilidade for reduzida, os microrganismos sintetizam as membranas de CB de modo a poderem flutuar até à interface gás-líquido onde vão poder obter mais oxigénio. Se não existir limitação de oxigénio a CB sintetizada terá uma forma distinta [43]. Esta condição para a formação de CB reflecte-se na forma como os microrganismos são cultivados [12]. Em cultura estática, em que a disponibilidade de oxigénio não é tão elevada como em cultura agitada, forma-se a membrana de celulose à superfície do meio de cultura, na interface ar-líquido, com crescimento no sentido do meio [37] (Figura 14 a)). Em meio agitado, com disponibilidade de oxigénio, a CB aparece sob a forma de *pellets*, como se pode ver na Figura 14 b)).



**Figura 14 – Celulose bacteriana produzida em meio estático (a) e em meio agitado (b).**

A escolha entre produção em cultura estática ou agitada depende do destino final pretendido ou das aplicações da CB, uma vez que, além da morfologia, as propriedades físicas e mecânicas do polímero formado dependem do método de cultura [37]. A cultura estática está amplamente investigada e a celulose produzida sob a forma de membrana é a normalmente utilizada nas aplicações comerciais. Por outro lado a cultura agitada revela-se também importante nomeadamente quando a CB é aplicada na investigação e desenvolvimento de novos materiais compósitos [39-41].

## 2.5. PRODUÇÃO DE CB A PARTIR DE SUBSTRATOS BARATOS

### 2.5.1. Substratos testados em trabalhos anteriores

Como foi mencionado anteriormente, este trabalho teve como objectivo tornar a produção de CB mais económica, através da utilização de resíduos ou subprodutos industriais de origem nacional. Além disso, esta é uma forma de valorizar as matérias-primas escolhidas.

Nas fermentações microbianas, o meio de cultura pode representar cerca de 30% do custo total do processo [44]. Consequentemente, um dos aspectos chave no processo fermentativo é o desenvolvimento de um meio de cultura de baixo custo de forma a diminuir o custo final do produto. A maioria dos estudos realizados sobre produção de CB foi realizada utilizando meios de cultura com açúcares simples puros como fonte de carbono. Para além disso, os meios contêm ainda fontes complexas de azoto e vitaminas como extracto de levedura (E.L.) e peptona [45-47]. Estes nutrientes são caros e tornam o meio economicamente desfavorável.

Usualmente, a glucose e a sacarose são utilizados como fonte de carbono para produção de CB, embora outras fontes de carbono como frutose, maltose, xilose, amido e glicerol tenham sido testadas[48]. *G. hansenii* PJK produziu 1.72 g/L de CB quando se utilizou glucose como fonte de carbono [14]. Uma estirpe de *Gluconacetobacter* sp.V6, isolada do vinagre tradicional, produziu 4.16 g/L de CB num meio complexo contendo glucose como fonte de carbono [47].

Ishiara *et al.* [49] utilizaram xilose como fonte de carbono para produção de CB por *G. xylinum* IFO 15606 e conseguiram obter 3 g/L de polímero. O manitol foi reportado como sendo uma boa fonte de carbono para produção de CB por *G. xylinum* NCIM2526 [50]. Um estirpe de *G. xylinus* isolada do chá Kombucha originou uma produção máxima de CB, 2.64 g/L, com manitol como fonte de carbono [51].

O efeito de diferentes fontes de carbono (manitol, glucose, glicerol, frutose, sacarose e galactose) na produção de celulose bacteriana por *G. xylinus* estirpe ATCC 53524 foi estudado por D. Mikkelsen e tal [52] e as suas propriedades, como a pureza e características estruturais, foram avaliadas. Os melhores resultados foram obtidos utilizando sacarose e glicerol com produção de 3.83 e 3.75 g/L após 4 dias,



respectivamente. Manitol, frutose e glucose também conduziram a boas produções de CB com valores superiores a 2.5 g/L. Verificou-se ainda que apesar dos diferentes substratos influenciarem a produtividade do processo as características moleculares do produto final não se alteraram [52].

No trabalho de Pourramezan *et al.* [53] forneceram-se à estirpe *Gluconacetobacter sp.* 4B-2 xilose, lactose e sacarose como fontes de carbono em meio HS em substituição da D-glucose. O melhor resultado foi obtido utilizando 1.5% de sacarose. A sacarose teve o maior rendimento, seguido da glucose, xilose e lactose. A maior quantidade produzida a partir da sacarose correspondeu uma menor velocidade de consumo de substrato em relação à glucose [53]. Verificou-se ainda que o pH e a temperatura óptima para a produção de BC foram, 7,0 e 30°C, respectivamente. Depois de otimizadas as condições de cultura foi alcançada a produção de 11.98 g/L de CB, utilizando sacarose.

Kim *et al.* [54] isolaram *Gluconacetobacter sp.* RKY5 de vinagre de dióspiro e tentaram otimizar as condições de operação da produção de CB. A composição do meio otimizada foi a seguinte (em %): 1.5 glicerol, 0.8 extracto de levedura, 0.3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0.3 ácido acético. Nesta cultura otimizada, a estirpe utilizada produziu 5.63 g/L de CB após 144 horas de cultura agitada e 4.59 g/L após 144 horas de cultura estática [54].

Tal como tem sido referido ao longo deste trabalho, os custos de produção de CB podem ser significativamente reduzidos através da utilização como substratos de resíduos ou subprodutos industriais de baixo valor acumulado pois a maioria destes resíduos constitui fontes ricas de nutrientes, como fonte de carbono (glucose, xilose, etc), sais, vitaminas, que podem ser utilizados pelos microrganismos como matéria-prima para produção de novos materiais. Diversos trabalhos de produção de CB a partir de substratos reais de baixo valor como sumos de fruta e resíduos ou subprodutos industriais encontram-se descritos na literatura [17, 55-58]. A partir de sumos de coco e de ananás, ambos suplementados com extracto de levedura e etanol, verificou-se uma produção de CB em cultura estática de, cerca de 500 g/L (estado hidratado) após 14 dias de cultivo [56]. Kurosumi *et al.* [57], também após 14 dias de cultivo obtiveram uma produção de 0.5 g/L de CB a partir de sumos de maçã, ananás, pêra japonesa ou uva e 2 g/L a partir de sumo de laranja [57]. Os mesmos autores conseguiram também obter quantidades de CB elevadas a partir de sumo de laranja (5.9 g/L) e ananás (4.1 g/L) suplementados com fontes de azoto, 2.0 % de peptona, 0.5 % de extracto de levedura e

0.12 % de ácido cítrico. A quantidade de CB produzida a partir dos resíduos de sumo de casca de laranja foi 0.04 g/L e 0.13 g/L, respectivamente [57]. Utilizando um meio contendo pó de Konjac suplementado com extracto de levedura e triptona, atingiu-se uma produção de CB de 1.5 g/L após 23 dias de incubação [17]. A utilização de um efluente do processamento da batata com baixo conteúdo de sólidos foi também testada. Este resíduo utilizado directamente como substrato após diluição para a produção de CB conduziu a uma concentração final de 3 g/L após 5 dias de incubação [58].

Vários autores consideram os melaços de beterraba e de cana-de-açúcar como bons substratos para a produção de CB e são vários os artigos que descrevem a sua utilização [5, 59]. Estes substratos têm um custo baixo e contêm cerca de 50% de açúcar, sendo a sacarose o açúcar predominante [5]. No trabalho de Keshk *et al.* [5], que se estudou a substituição de glucose como única fonte de carbono por melaços de beterraba, a quantidade de CB obtida por *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245 aumentou com o aumento da quantidade de melaço utilizado e consequente diminuição da glucose no meio. O valor máximo de CB foi obtido com 100% de melaço, 1.75 g [5]. Os melaços de cana-de-açúcar foram utilizados por Premjet *et al.* [59] como substrato na produção de celulose bacteriana após tratamento por permuta iónica de modo a obter uma fracção rica em açúcar, melaços clarificados, e um resíduo negro (este resíduo ficou retido na coluna e foi eluído posteriormente) [59]. A fracção clarificada obtida era rica em sacarose, glucose, compostos azotados, ácidos nucleicos, vitaminas, outros hidratos de carbono e minerais [59]. A fracção clarificada e o resíduo negro foram fornecidos individualmente ou misturas suplementadas com meio HS e os seus efeitos na produção de BC por *G. xylinum* ATCC 10245 foram investigados. A adição de vitaminas, aminoácidos, outros hidratos de carbono, minerais e resíduo negro aos melaços, contribuiu para o aumento do rendimento em 210%, 193%, 186%, 160% e 255%, respectivamente. O resíduo negro foi o componente que mais contribuiu para o aumento da produção de CB [59].

Resíduos da indústria da cerveja, reportados na literatura como ricos em fonte de carbono e azoto, foram testados por Ha *et al.* [60] e a quantidade de CB produzida após 5 dias de incubação em cultura estática, foi de 4,52 g/L [60]. Este valor foi dez vezes superior aos 0,45 g/L produzidos em meio de composição definida HS. A adição de 1% de glucose ao resíduo permitiu aumentar a produção de CB de 8,46 g/L (este valor também foi obtido ao fim de 14 dias) para 13,95 g/L após 14 dias de incubação [60].

O efeito do pH e das concentrações de sacarose e sulfato de amónia foi estudado por Jagannath *et al.* [55]. Verificou-se neste trabalho que a maior quantidade de CB produzida, 61 g (peso húmido), se obteve com a combinação de pH 4, 10% de sacarose e 0,5% de sulfato de amónio. Esta combinação de condições de operação permitiu obter uma membrana com o maior valor de espessura, 10.2 mm, e uma elevada capacidade de retenção de água [55].

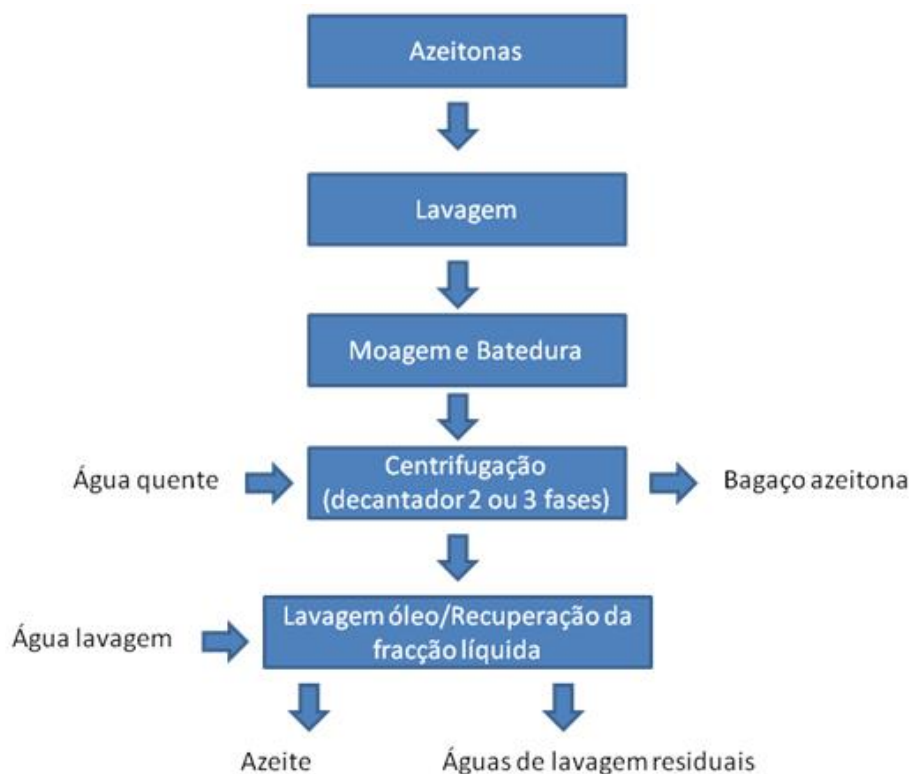
Como se pode ver pelos exemplos citados da literatura a maioria dos resíduos foram suplementados com outras fontes de nutrientes, como o extracto de levedura ou a peptona, que embora contribuam para a produção de CB podem resultar num aumento dos custos de produção.

## **2.5.2. Substratos a testar no presente trabalho**

### **2.5.2.1. *Resíduos de Azeitona***

Ao longo do tempo, o azeite tem sido referido como um item importante para a saúde e inclusão nas dietas alimentares em todo o mundo. Os dados mostram que 80.2% da produção Mundial, 2.056.200 toneladas, foram produzidas nos países da região do Mediterrâneo [61]. Portugal, o quarto maior produtor Mundial, com cerca de 60 mil toneladas produzidas anualmente [62], tem vindo a assistir a uma revolução e franca expansão neste sector em específico. Devido ao aumento da produção de azeite esta indústria gera grandes quantidades de resíduos poluentes que devem ser tratados, contribuindo para os custos da produção. Estima-se que anualmente e a nível mundial se produzam cerca de 5.8 milhões de toneladas destes resíduos [61].

Os resíduos obtidos são maioritariamente conhecidos como bagaços e resultam do passo em que é extraído o azeite. Na Figura 15 esquematiza-se o processo da produção de azeite indicando-se os resíduos gerados.



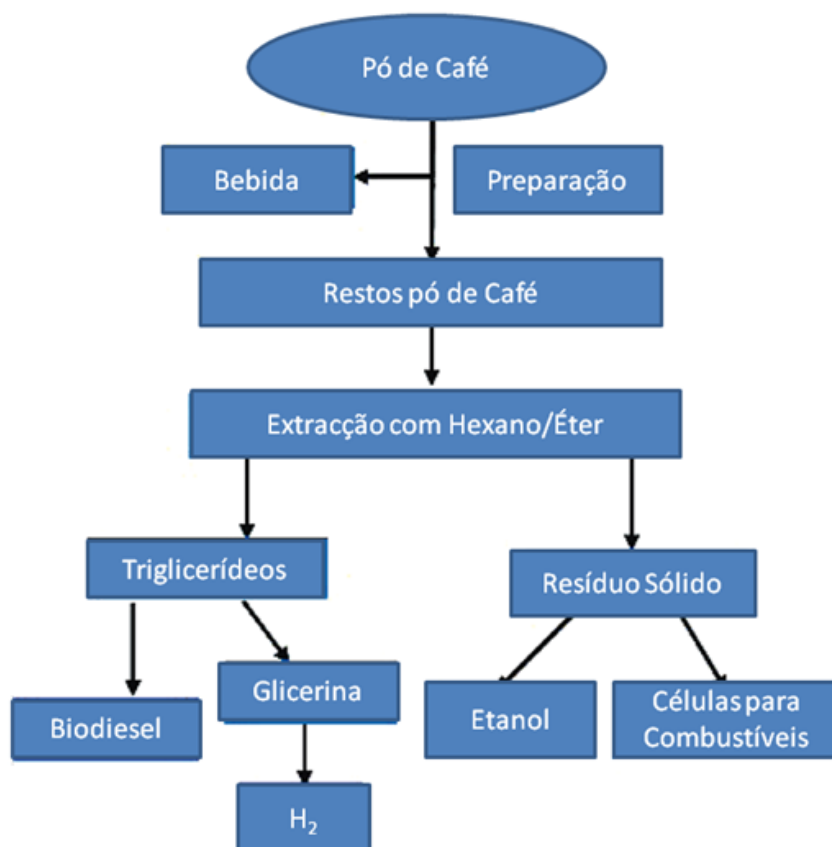
**Figura 15 – Esquema de Extracção do azeite com formação bagaço da azeitona.**

A nível de caracterização e de acordo com dados fornecidos pelo fornecedor do resíduo, o bagaço utilizado neste trabalho constituição é constituído por açúcares como glucose e frutose e apresenta uma carga orgânica elevada, principalmente a nível proteico.

#### **2.5.2.2. Borra de Café**

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo e as borras o resíduo sólido proveniente do pó de café com a junção de água quente na preparação de café instantâneo, componente maioritário na indústria de resíduos de café com uma produção anual de 6 toneladas [63]. Considerando a quantidade anual enorme de borra produzida (6 toneladas), a utilização deste resíduo é um assunto relevante para discussão e investigação.

Na literatura encontram-se vários estudos para reutilizar este resíduo, nomeadamente como fonte de material antioxidante, com actividade imunomodulatória ou para a produção de biodiesel, Figura 16 [64].



**Figura 16 – Utilização das Borrás de café na produção de compostos entre os quais biodiesel [65] .**

A borra de café é considerada um absorvente fácil e barato para a remoção de corantes catiónicos em tratamento de águas residuais [66]. No entanto, nenhuma das estratégias foi ainda realmente implementada e sendo assim, estes resíduos continuam a não ser utilizados e são descarregados no ambiente onde causam graves contaminações e poluição devido à sua natureza tóxica (presença de cafeína, taninos, polifenóis) [67].

Os principais componentes da borra de café apresentam-se na Tabela 2.

**Tabela 2 – Composição química da borra de café [67].**

| <b>Componentes</b>  | <b>Peso seco (g/ 100 g)</b> |
|---------------------|-----------------------------|
| Celulose (glucanas) | 8.6                         |
| Hemicelulose        | 36.7                        |
| Arabinanas          | 1.7                         |
| Galactanas          | 13.8                        |
| Mananas             | 21.2                        |
| Proteínas           | 13.6                        |
| Grupos acetilo      | 2.2                         |
| Cinzas              | 1.6                         |
|                     |                             |
| <b>Minerais</b>     | <b>(mg/Kg)</b>              |
| Potássio            | 3549.0                      |
| Fósforo             | 1475.1                      |
| Magnésio            | 1293.3                      |
| Cálcio              | 777.4                       |
| Alumínio            | 279.3                       |
| Ferro               | 118.7                       |
| Manganês            | 40.1                        |
| Cobre               | 32.3                        |
| Zinco               | 15.1                        |
| Enxofre             | Nd                          |
| Crómio              | Nd                          |

## 2.6. PLANEAMENTO DE EXPERIÊNCIAS

Os desenhos factoriais ou planeamento de experiências são amplamente utilizados em experiências em que intervêm vários factores (variáveis independentes, VI) para estudar o efeito conjunto destes sobre uma resposta (variáveis dependentes, VD) [68]. Uma forma clássica de extrair informação das VI sobre as VD consiste em variar uma VI de cada vez, ou seja, para um sistema de variáveis independentes fixam-se valores constantes para todas as VI excepto uma (VI1). Desta forma avaliam-se as VD (respostas) para valores distintos desta VI1, mantendo constante todos os valores das outras VI. Assim, determina-se o melhor valor da VI1. Posteriormente realiza-se o mesmo processo mas agora para a VI2, VI3 até percorrer todas as VI. No entanto esta abordagem clássica de abordar o problema é inadequada porque requer a realização de uma grande quantidade de experiências e não tem em conta os efeitos sobre as VD que tem a variação simultânea das várias VI [68].

Pelas razões apresentadas, os desenhos factoriais são os mais eficientes para o tipo de situação a estudar, pois as VI (factores) tomam poucos valores dentro de uma zona de variação a estudar, diminuindo o número de experiências a realizar. Outras vantagens são evitar conclusões enganosas, quando existe uma interacção ou efeito sinérgico entre as variáveis. Além disso permitem estimar efeitos de um factor em diversos níveis de outros factores, produzindo conclusões que são avaliadas em toda a zona de variação das condições experimentais. Esta não será a primeira vez que os desenhos factoriais são utilizados para estudar o comportamento da produção de CB. Hutchens et al [69] utilizaram esta metodologia para estudar a produção de CB por *G. hansenii* e concluíram que fonte de carbono, adição de etanol e temperatura são factores significativos na produção de CB. Por outro lado verificaram que apesar do efeito do pH só por si não afectava significativamente a produção de CB o efeito combinado do pH e fonte de carbono afectava a produção de CB.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. MICRORGANISMO**

O Microrganismo utilizado neste trabalho foi isolado a partir de chá de Kombucha, uma bebida tradicional do sudeste asiático, e identificado como *Gluconacetobacter sacchari* [16].

### **3.2. MEIO DE CULTURA**

O meio de cultura base utilizado para a produção CB e manutenção da estirpe ao longo deste trabalho foi o meio Hestrin-Schram (HS) composto por 20 g/L de glucose, 5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levedura, 1.15 g/L de ácido cítrico e 2.7 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . O pH do meio de cultura foi sempre ajustado com uma solução de ácido acético diluído 1:1 (v/v) para 5. No meio HS sólido a quantidade de agar utilizada foi 20 g/L.

### **3.3. RESÍDUOS**

#### **3.3.1. Resíduos da Azeitona**

Os resíduos de azeitona utilizados foram bagaço líquido (L), bagaço extractado seco (S) e caroço líquido (C), fornecidos pelo CEBAL – Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Baixo Alentejo e Litoral.

#### **3.3.2. Borrás de Café**

As borras de café foram obtidas do bar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Antes da sua utilização procedeu-se a uma extracção em Soxhlet para extracção do óleo utilizando a montagem que se apresenta na Figura 17. A extracção foi feita com hexano acima de 60°C durante 4h. A solução de hexano e óleo



de café foi filtrada utilizando uma membrana com poros de diâmetro de 0,2 µm. Finalmente evaporou-se o hexano em evaporador rotativo Heidolph-modelo laborota 4000.



**Figura 17 – Esquema de montagem da Extração Soxhlet.**

### **3.3.3. Tratamento dos resíduos**

Os resíduos utilizados, bagaço extractado seco (Resíduo S), borra antes da extracção óleo (Ba) e borras depois extracção óleo (Bd), foram submetidos a duas extracções aquosas, nomeadamente a 40 °C e 100 °C durante quatro horas e uma hidrólise ácida a 100 °C com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M resultando 9 extractos, S 40, S100, S H, Ba 40, Ba 100, Ba H, Bd 40, Bd 100 e Bd H.

Todos os extractos obtidos foram posteriormente filtrados e/ou centrifugados.

## **3.4. ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE CB**

### **3.4.1. Inóculo**

Para cada ensaio transferiu-se uma colónia crescida em meio HS sólido para 50 mL de meio HS líquido e incubou-se durante 48 horas a 28°C sem agitação. Da

suspensão de bactérias resultante, de concentração conhecida (normalmente com uma DO entre 0.2 e 0.25 a 600 nm) retirou-se um determinado volume para inocular os earlenmeyers onde decorreram os ensaios de modo a corresponder a 10% (V/V) do meio de cultura. Todos os inóculos foram realizados em condições de esterilidade numa câmara de fluxo laminar.

### **3.4.2. Ensaios para produção de CB Amostragem**

#### **3.4.2.1. *Seleção Resíduos da azeitona***

Inicialmente, o resíduo sólido S foi submetido a uma extracção aquosa a 40 °C durante quatro horas na razão 1:4 (sólido/líquido). Os resíduos do bagaço e caroço juntamente com o extracto S 40 obtido anteriormente foram filtrados e posteriormente esterilizados em autoclave a 121°C durante 22 minutos. Para testar a eficiência na produção de CB dos três resíduos, foram colocados 45 mL de cada resíduo em Earlenmeyers de 250 mL (esterilizados) com 5 mL de inóculo, durante 96 horas de cultura. Após 96 horas foi retirada de cada um dos Earlenmeyers a respectiva membrana de CB, purificada e seca conforme indicado posteriormente e efectuado o cálculo da quantidade produzida em g/L (g peso seco/volume de meio) (em todos os ensaios posteriores os processos de esterilização e lavagem e purificação são iguais).

#### **3.4.2.2. *Estudo necessidade adição de sais***

##### **3.4.2.2.1. *Resíduo do bagaço líquido e extracto S 40 com adição de sais***

Ao resíduo líquido bagaço foi adicionado sais fosfato de potássio e sulfato de amónia em conjunto nas concentrações referidas na tabela. Ao extracto S 40 foi adicionado sulfato de amónia e fosfato de potássio individualmente e em conjunto nas concentrações referidas na Tabela 3.

**Tabela 3 – Caracterização das amostras do bagaço líquido e do extracto S 40 com suplementação de sais.**

| Nome da amostra | Caracterização da Amostra   |
|-----------------|---|
| A1              | Extracto S 40 com adição de 1 g/L de sulfato de amónia e 1 g/L de fosfato de potássio             |
| B1              | Extracto S 40 ° com adição de 8g/L de sulfato de amónia e 8 g/L de fosfato de potássio            |
| C1              | Resíduo líquido bagaço (L) com adição de 1g/L de sulfato de amónia e 1 g/L de fosfato de potássio |
| D1              | Resíduo líquido bagaço (L) com adição de 8g/L de sulfato de amónia e 8 g/L de fosfato de potássio |
| E1              | Extracto S 40 com adição de 1 g/L de sulfato de amónia  |
| F1              | Extracto S 40 com adição de 5 g/L de sulfato de amónia  |
| G1              | Extracto S 40 com adição de 10 g/L de sulfato de amónia   |
| H1              | Extracto S 40 com adição 1 g/L fosfato de potássio  |
| I1              | Extracto S 40 com adição de 5 g/L fosfato de potássio   |
| J1              | Extracto S 40 com adição de 10 g/L fosfato de potássio  |
| K1              | Meio Referência HS com glucose como fonte de carbono  |

#### *3.4.2.2.2. Planeamento experimental 96 horas*

Ao extracto S 40 foram adicionadas as concentrações combinadas dos sais fosfato de potássio e sulfato de amónia.

Tabela 4 – Caracterização das amostras extracto S 40 planeamento experimental 96 horas.

| Nome da amostra | Caracterização da Amostra  |
|-----------------|--|
| A2              | Extracto S 40 com adição de 8 g/L de sulfato de amónia e 8g/L de fosfato de potássio     |
| B2              | Extracto S 40 com adição de 8g/L de sulfato de amónia e de 1 g/L fosfato de potássio     |
| C2              | Extracto S 40 com adição de 1g/L de sulfato de amónia e de 8 g/L fosfato de potássio     |
| D2              | Extracto S 40 com adição de 1g/L de sulfato de amónia e de 1 g/L fosfato de potássio     |
| E2              | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e de 8 g/L fosfato de potássio   |
| F2              | Extracto S 40 com adição de 8g/L de sulfato de amónia e de 4.5 g/L fosfato de potássio   |
| G2              | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e de 1 g/L fosfato de potássio   |
| H2              | Extracto S 40 com adição de 1g/L de sulfato de amónia e de 4.5 g/L fosfato de potássio   |
| I2.1            | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e de 4.5 g/L fosfato de potássio |
| I2.2            | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e de 4.5 g/L fosfato de potássio |
| K2              | Meio Referência HS com glucose como fonte de carbono                                     |

#### 3.4.2.2.3. Planeamento experimental 24 e 60 horas

Ao extracto S 40 foram adicionadas as concentrações combinadas dos sais fosfato de potássio e sulfato de amónia nas concentrações apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5 – Caracterização das amostras planeamento experimental 24 horas**

| <b>Ensaio</b> | <b>Caracterização da Amostra</b>  |
|---------------|---|
| A3            | Extracto S 40 com adição de 8 g/L de sulfato de amónia e fosfato de potássio          |
| B3            | Extracto S 40 com adição de 8g/L de sulfato de amónia e 1 g/L fosfato de potássio     |
| C3            | Extracto S 40 com adição de 1g/L de sulfato de amónia e 8 g/L fosfato de potássio     |
| D3            | Extracto S 40 com adição de 1g/L de sulfato de amónia e 1 g/L fosfato de potássio     |
| E3            | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e 8 g/L fosfato de potássio   |
| F3            | Extracto S 40 com adição de 8g/L de sulfato de amónia e 4.5 g/L fosfato de potássio   |
| G3            | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e 1 g/L fosfato de potássio   |
| H3            | Extracto S 40 com adição de 1g/L de sulfato de amónia e 4.5 g/L fosfato de potássio   |
| I3            | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e 4.5 g/L fosfato de potássio |
| I3.1          | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e 4.5 g/L fosfato de potássio |
| K3            | Meio Referência HS com glucose como fonte de carbono                                  |

**Tabela 6 – Caracterização das amostras planeamento experimental 60 horas**

| <b>Nome da amostra</b> | <b>Caracterização da Amostra</b>   |
|------------------------|--|
| A4                     | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e 8 g/L fosfato de potássio    |
| B4                     | Extracto S 40 com adição de 8g/L de sulfato de amónia e 4.5 g/L fosfato de potássio    |
| C4                     | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e 1 g/L fosfato de potássio    |
| D4                     | Extracto S 40 com adição de 1g/L de sulfato de amónia e de 4.5 g/L fosfato de potássio |
| E4                     | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e 4.5 g/L fosfato de potássio  |
| E4.1                   | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e 4.5 g/L fosfato de potássio  |
| E4.2                   | Extracto S 40 com adição de 4.5g/L de sulfato de amónia e 4.5 g/L fosfato de potássio  |

### ✓ **Evolução produção CB com Extracto S 40**

Em seis Erlenmeyers foram colocados 45 mL de resíduo S com 5 mL de inoculo e deixados a crescer com diferentes tempos de cultura. Ao fim de 24, 48, 56, 72 e 96 foram retiradas as mantas, respectivamente.

Tabela 7 – Caracterização das amostras da Evolução Produção de CB com o extracto S40 com o tempo

| Nome da amostra | Caracterização da Amostra                   |
|-----------------|---|
| P24             | Extracto S 40 com tempo de cultura 24 horas |
| P32             | Extracto S 40 com tempo de cultura 32 horas |
| P48             | Extracto S 40 com tempo de cultura 48 horas |
| P56             | Extracto S 40 com tempo de cultura 56 horas |
| P72             | Extracto S 40 com tempo de cultura 72 horas |
| P96             | Extracto S 40 com tempo de cultura 96 horas |

### 3.4.2.3. *Resíduo S com diferentes extracções*

Tabela 8 – Caracterização das amostras do extractos do resíduo S

| Nome da amostra | Caracterização da Amostra                            |
|-----------------|--|
| A5              | Extracto S 40 sem adição de sais                     |
| B5              | Extracto S 40 com adição dos componentes do meio HS  |
| C5              | Extracto S 100 sem adição de sais                    |
| D5              | Extracto S 100 com adição dos componentes do meio HS |
| E5              | Hidrolisado S H sem adição de sais                   |
| F5              | Hidrolisado S H com adição componentes do meio HS    |
| G5              | Meio referência HS com glucose como fonte de carbono |

### 3.4.2.4. *Borras*

#### 3.4.2.4.1. *Produção de CB utilizando resíduos Ba e Bd com diferentes tipos de extracções*

Foram testados os extractos dos resíduos Ba e Bd sem qualquer adição de nutrientes e também com adição dos componentes do meio de referência HS, ou seja, a cada extracto foram adicionados extracto de levedura, peptona, ácido cítrico e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  nas concentrações estipuladas anteriormente.

**Tabela 9 – Caracterização das amostras dos extractos dos resíduos Ba e Bd**

| <b>Nome da amostra</b> | <b>Caracterização Amostra</b>                          |
|------------------------|--|
| A6                     | Extracto Ba 40 sem adição de sais                      |
| B6                     | Extracto Ba com adição dos componentes do meio HS      |
| C6                     | Extracto Ba 100 sem adição de sais                     |
| D6                     | Extracto Ba 100 com adição dos componentes do meio HS  |
| E6                     | Hidrolisado Ba H sem adição de sais                    |
| F6                     | Hidrolisado Ba H com adição dos componentes do meio HS |
| G6                     | Extracto Bd 40 sem adição de sais                      |
| H6                     | Extracto Bd 40 com adição dos componentes do meio HS   |
| I6                     | Extracto Bd 100 sem adição de saisa                    |
| J6                     | Extracto Bd 100 com adição dos componentes do meio HS  |
| K6                     | Hidrolisado Bd H sem adição de sais                    |
| L6                     | Hidrolisado Bd H com adição dos componentes do meio HS |
| M6                     | Meio Referência HS com glucose como fonte de carbono   |

*3.4.2.4.2. Produção de BC utilizando os extractos dos resíduos Ba a Bd com suplementação de sais*

Aos extractos dos resíduos Ba e Bd foram adicionados individualmente fosfato de potássio e sulfato de amónia nas concentrações referidas na Tabela 10.

**Tabela 10 – Caracterização das amostras dos extractos dos resíduos Ba e Bs com adição de sais**

| <b>Nome da amostra</b> | <b>Caracterização Amostra</b>                                       |
|------------------------|---|
| A7                     | Extracto Ba 40 com adição 1 g/L de sulfato de amónia                |
| B7                     | Extracto Ba 40 com adição 5 g/L de sulfato de amónia                |
| C7                     | Extracto Ba 40 com adição 10 g/L de sulfato de amónia               |
| D7                     | Extracto Ba 40 com adição 1 g/L de sulfato de fosfato de potássio   |
| E7                     | Extracto Ba 40 com adição 5 g/L de sulfato de fosfato de potássio   |
| F7                     | Extracto Ba 40 com adição 10 g/L de sulfato de fosfato de potássio  |
| G7                     | Extracto Ba 100 com adição 1 g/L de sulfato de amónia               |
| H7                     | Extracto Ba 100 com adição 5g/L de sulfato de amónia                |
| I7                     | Extracto Ba 100 com adição 10 g/L de sulfato de amónia              |
| J7                     | Extracto Ba 100 com adição 1 g/L de sulfato de fosfato de potássio  |
| K7                     | Extracto Ba 100 com adição 5 g/L de sulfato de fosfato de potássio  |
| L7                     | Extracto Ba 100 com adição 10 g/L de sulfato de fosfato de potássio |
| M7                     | Extracto Bd 40 com adição 1 g/L de sulfato de amónia                |
| N7                     | Extracto Bd 40 com adição 5 g/L de sulfato de amónia                |
| O7                     | Extracto Bd 40 com adição 10 g/L de sulfato de amónia               |
| P7                     | Extracto Bd 40 com adição 1 g/L de fosfato de potássio              |
| Q7                     | Extracto Bd 40 com adição 5 g/L de fosfato de potássio              |
| R7                     | Extracto Bd 40 com adição 10 g/L de fosfato de potássio             |
| S7                     | Extracto Bd 100 com adição 1g/L de sulfato de amónia                |
| T7                     | Extracto Bd 100 com adição 5g/L de sulfato de amónia                |
| U7                     | Extracto Bd 100 com adição 10g/L de sulfato de amónia               |
| V7                     | Extracto Bd 100 com adição 1g/L de fosfato de potássio              |
| X7                     | Extracto Bd 100 com adição 5g/L de fosfato de potássio              |
| Y7                     | Extracto Bd 100 com adição 10g/L de fosfato de potássio             |
| Z7                     | Meio referência HS com glucose como fonte de carbono                |

### 3.5. LAVAGEM E PURIFICAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CB

Após 4 dias inoculação, as membranas de CB foram retiradas dos respectivos Erlenmeyers e lavadas três vezes com NaOH 0.5M a 80°C durante meia hora. Posteriormente realizaram-se lavagens adicionais com água da torneira, até neutralizar o pH, e com água destilada para remoção dos sais. As membranas purificadas foram colocadas numa estufa a 100°C até o peso estabilizar e a CB produzida foi quantificada por peso seco.



### **3.6. QUANTIFICAÇÃO AÇÚCARES**

#### **3.6.1. Açúcares redutores**

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método do DNS em que o ácido 3,5-dinitro-salicílico reage com os açúcares redutores, dando origem a um composto corado com o máximo de absorvância a 540 nm. A solução de DNS prepara-se da seguinte forma: primeiro preparam-se as soluções A e B. Para a solução A são necessários 150 g de tartarato de sódio e potássio que se dissolvem em 450 mL de água destilada e se aquecem a 90°C. A solução B é constituída por 50 mL de NaOH 2M a qual após o seu aquecimento até à ebulição se juntam 5 g de DNS. No final as duas soluções juntam-se a quente ( $\approx 90^\circ\text{C}$ ) e a solução resultante coloca-se a agitar à temperatura ambiente de um dia para o outro. Após este período filtra-se a solução obtida. A 1 mL de amostra foi adicionado 1 mL de solução de reagente de DNS, sendo depois aquecidos a 100°C durante 5 minutos. Foi também preparado um branco constituído por 1 mL de DNS e 1 mL de água destilada. Após o aquecimento, adicionou-se a cada tubo, 8 mL de água destilada até completar o volume total de 10 mL. Finalmente foi medida a absorvância a um comprimento de onda de 540 nm. Para quantificação dos açúcares dos resíduos foi construída uma curva-padrão com várias soluções de glucose numa gama de concentrações entre 0,2 g/L e 1,0 g/L.

#### **3.6.2. Quantificação dos açúcares por HPLC**

Os açúcares glucose frutose arabinose galactose e xilose foram quantificados por HPLC usando uma coluna Purospher STAR  $\text{NH}_2$ , e um detector de índice de refração (Hitashi). O eluente, uma solução de acetonitrilo/água destilada 75:25, foi bombeado com um caudal de 1.0 mL/min e a temperatura de operação foi de 25 °C. O volume injectado foi 20  $\mu\text{L}$ . Todas as amostras foram centrifugadas e filtradas com membranas de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  antes da análise. Para os açúcares considerados foram efectuadas curvas de calibração utilizando padrões com concentrações entre 0.125 e 1 g/L.

### 3.7. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CB

As membranas de CB utilizadas para caracterização foram produzidas, lavadas, purificadas e secas conforme descrito anteriormente. Os métodos utilizados na sua caracterização descrevem-se de seguida.

#### 3.7.1. Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos num espectrómetro Perkin Elmer FTIR System equipado com uma única célula horizontal Golden Gate ATR.

#### 3.7.2. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

As micrografias de microscopia electrónica de varrimento da superfície das membranas de CB foram obtidas utilizando um microscópio Hitachi SU-70 operando a 15kV e utilizando amostras revestidas de carbono.

### 3.8. DESENHO EXPERIMENTAL

De acordo com os procedimentos *standard* de desenho e análise de experiências (REF), as variáveis independentes (tempo, concentração entre 1g/L e 8 g/L de sais sulfato de amónia e fosfato de potássio) foram estandardizadas de modo que o respectivo intervalo de variação fosse (-1,1).

Os dados experimentais foram analisados como variáveis dependentes, concentração g/L de CB produzida e submetidos a uma regressão multivariável contra as variáveis independentes utilizando funções polinómicas como:

$$DV = b_0 + \sum_{j=1}^n b_j X_j + \sum_{j=1, j \leq k}^n b_{jk} X_j X_k \quad 1)$$

Onde DV representa o número de variáveis dependentes examinadas no estudo e  $X_j$  e  $X_k$  representam as variáveis independentes normalizadas. Os diferentes valores de

b<sub>0</sub>, b<sub>j</sub> e b<sub>jk</sub> representam os parâmetros pelos quais, devido à normalização, podemos determinar e comparar os efeitos de cada variável independente na(s) variável/variáveis dependente(s) [68].

Para realizar o desenho factorial e a regressão multivariante foi utilizado o software STATGRAPHICS Plus 5.1.

### 3.9. CÁLCULOS

O rendimento CB/Substrato, Y<sub>CB/S</sub>, foi determinada pela expressão:

$$Y_{CB/S} = \frac{\Delta CB}{\Delta S}, \quad 2)$$

onde  $\Delta CB$  é quantidade de CB produzida e  $\Delta S$  é a quantidade de substrato consumido.

O grau de conversão  $\alpha$  foi determinado pela expressão:

$$\alpha = \frac{\Delta S}{S_i}, \quad 3)$$

onde  $\Delta S$  é a quantidade de substrato consumido e  $S_i$  a concentração de substrato inicial.

A produtividade de CB,  $\Gamma_{CB}$ , foi determinada pela expressão:

$$\Gamma_{CB} = \frac{\Delta CB}{tc}, \quad 4)$$

onde  $\Delta CB$  é a quantidade de CB produzida e  $tc$  o tempo de cultura.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ENSAIOS COM RESÍDUOS DE AZEITONA

#### 4.1.1. Selecção Resíduos

No início deste trabalho foram realizados ensaios preliminares aos três resíduos provenientes da indústria da produção de azeite com o objectivo de avaliar a sua utilização como substrato para a produção de celulose bacteriana (CB) após um primeiro pré-tratamento. Os resíduos utilizados foram: dois líquidos, bagaço (L) e caroço (C), e um resíduo sólido, o bagaço extractado seco (S). Como o resíduo S era sólido para que pudesse ser utilizado procedeu-se a uma extracção aquosa a 40 °C, originando um extracto aquoso, S 40. Os resultados obtidos após 96 horas incubação juntamente com os resultados de uma experiência efectuada em simultâneo com o meio definido HS com glucose como fonte de carbono apresentam-se na Figura 18.

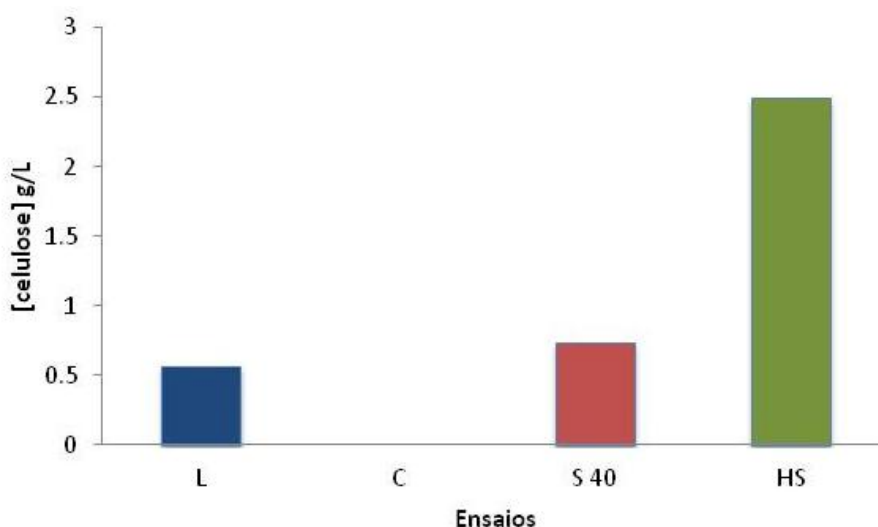


Figura 18 – Ensaio Preliminar com os resíduos L, C e extracto S40.

Os resultados mostram que não ocorreu produção de CB quando se utilizou o resíduo do caroço (C). Ocorreu produção de CB a partir do resíduo do bagaço (L), 0.56 g/L, e do extracto S 40, 0.74 g/L. Mas quando se comparam com a quantidade de CB a partir do meio HS com glucose, 2.5 g/L, correspondem a cerca de 29% (S 40) e 22% (L). De qualquer forma estes dois resíduos apresentam resultados muito promissores a

nível de produção de CB uma vez que se tratam de resíduos sem nenhuma adição de nutrientes, enquanto que o meio HS é um meio rico em nutrientes.

#### 4.1.2. Ensaio com suplementação com fontes de azoto e fósforo

Devido aos resultados promissores dos ensaios preliminares efectuados com estes resíduos, o passo seguinte foi verificar se a adição de fontes suplementares de azoto e fósforo teria efeito na produção de CB por *G. sacchari*. Os resultados dos ensaios efectuados, descritos na Tabela 3 da secção 3.4.2.2.1 dos Materiais e Métodos, apresentam-se na Figura 19.

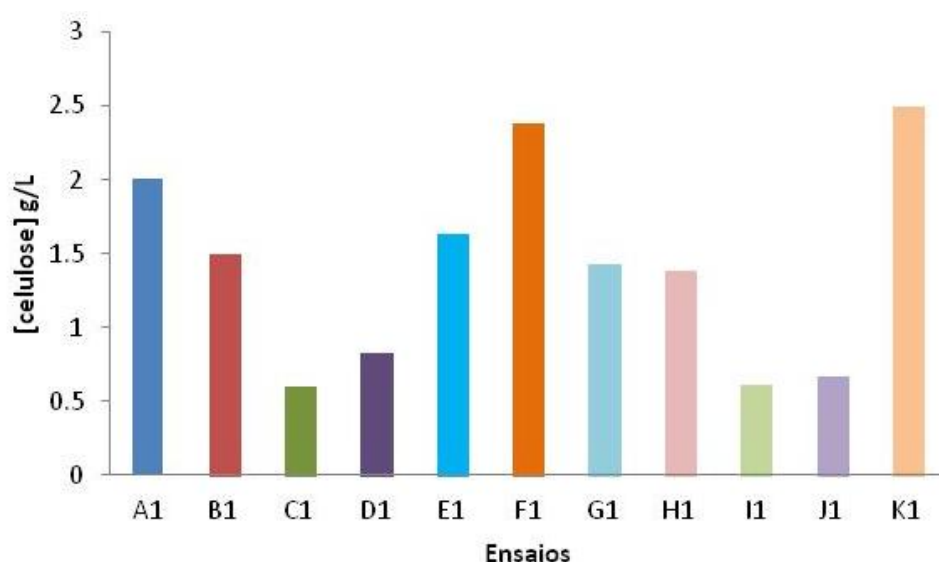


Figura 19 – Resíduo L e extracto S 40 suplementados com fosfato de potássio e sulfato de amónia.

Os resultados obtidos que se apresentam na Figura 19 mostraram um aumento da produção de CB para o resíduo L e para o extracto S 40 com a adição de sais, embora com impactos distintos. Enquanto com a adição de sais no caso do bagaço, o aumento não foi muito significativo, apenas de 0.56 para 0.60 g/L com a adição combinada de 1 g/L+ 1 g/L (C1) e de, 56 para 0,82 g/L com a adição de 8 g/L+ 8 g/L (D1), no caso do extracto do resíduo sólido a produção duplicou, para 1.5 g/L com adição de 1g/L+1 g/L(B1) e 2.01 g/L com adição de 8 g/L+8 g/L (A1). Na adição de sais individualmente ao extracto do resíduo sólido verificou-se também um aumento na produção de CB para o dobro, 1.63 g/L, com a adição de 1g/L de sulfato de amónia (E1) e para o triplo, 2.4

g/L, com a adição de 5 g/L de sulfato de amónia (F1). No caso da adição individual de fosfato de potássio ao extracto S 40 apesar de existir aumento de produção, o aumento de concentração de fosfato de potássio parece ter um efeito inibitório na produção, 1,39 g/L (H1), 0,61 g/L (I1) e 0,66 g/L (J1) com a adição de 1, 5 e 10 g/L respectivamente.

**Tabela 11 – Concentração de açúcares no final dos ensaios efectuados com residuo L e extracto S 40 suplementados com fosfato de potássio e sulfato de amónia.**

| Ensaio | Xilose g/L | Frutose g/L | Glucose g/L | CB g/L |
|--------|------------|-------------|-------------|--------|
| A1     | 0,127      | 2,091       | 1,229       | 2,008  |
| B1     | 0,134      | 1,979       | 1,414       | 1,498  |
| E1     | 0,129      | 2,399       | 1,347       | 1,634  |
| F1     | 0,102      | 1,691       | 1,111       | 2,376  |
| G1     | 0,092      | 2,248       | 1,641       | 1,426  |
| H1     | 0,111      | 2,238       | 2,409       | 1,386  |
| I1     | 0,121      | 2,909       | 2,592       | 0,612  |
| J1     | 0,095      | 2,361       | 2,269       | 0,664  |

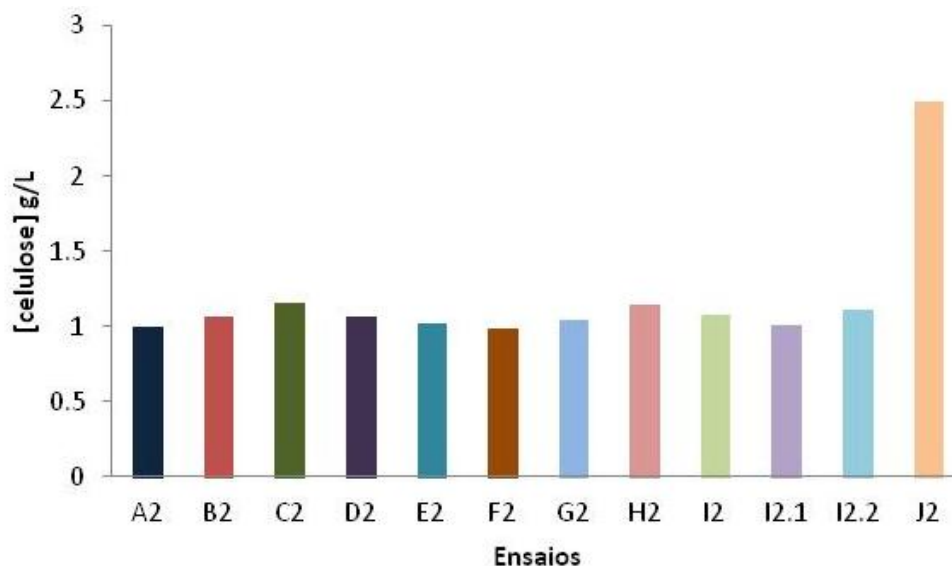
Os resultados da Tabela 11 mostram que a fonte que está a ser consumida preferencialmente é a glucose. Além disso verifica-se que nas amostras onde existiu maior produção de CB, A1 e F1, com 2,01 e 2,4 g/L, respectivamente, foram aquelas em que ocorreu um maior consumo de glucose (de 10,01 para 1,229 no caso do A1 e 10,01 para 1,111 no caso do F1). Também é de notar que no ensaio F1 a produção de CB foi semelhante à produzida em meio HS (K1). Carreira et al. [70] também estudaram a suplementação de resíduos com sais, mas nunca alcançaram valores de produção em nenhum dos resíduos testados (máximo de 1 g/L com um resíduo da indústria vinícola suplementado com extracto de levedura e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) como obtidos com estes resíduos.

Sendo o resíduo S o mais promissor em termos de produção de CB, o passo seguinte foi aprofundar o estudo da necessidade de suplementar o extracto do resíduo sólido com adição de sais de sulfato de amónia e fosfato de potássio.

#### 4.1.3. Planeamento experimental: ensaios de 96h com sais

Tendo em conta a produção de CB no ensaio preliminar do extracto do resíduo sólido sem adição de sais, 0,74 g/L e os resultados obtidos nos ensaios com a adição de sais foi implementado um modelo de planeamento experimental a fim de definir as

melhores combinações de concentrações dos sais de azoto e fósforo. Os ensaios efectuados, descritos na Tabela 4 na secção 3.4.2.2.2 dos Materiais e Métodos duraram 96 horas e os resultados apresentam-se na Figura 20.



**Figura 20 – Quantidades de CB produzidas durante os ensaios do planeamento experimental de 96 horas.**

Os resultados obtidos mostram uma melhoria de 30% na produção de CB em relação à produção com o extracto S 40 sem sais. Assim os resultados mostraram mais uma vez que a suplementação do extracto S40 com sais de azoto e de fósforo resultava num aumento da produção de CB. No entanto, uma análise mais detalhada aos resultados aplicando o modelo de planeamento experimental permitiu verificar que não se conseguiu, nas condições dos ensaios, chegar a uma combinação de concentrações de fontes de azoto e de fósforo que permitisse aumentar a quantidade de CB produzida, porque a produção de CB para todas as amostras se encontra num valor médio de  $1.06 \text{ g/L} \pm 0.032 \text{ g/L}$ . O coeficiente de correlação obtido quando aplicado o modelo experimental aos resultados da produção de CB foi muito baixo, 45%. Além disso, este valor poderia indicar que não existiria à partida uma relação entre a produção de CB e a adição de sais, ou, então, outra situação poderia estar a condicionar o ensaio. Neste caso a adição de sais aos extractos pode ser equiparado com o trabalho realizado por Carreira et al. [70] também utilizando *G. sacchari*. A adição de sais utilizados por estes autores também teve o melhor resultado de produção de CB com a adição de extracto de levedura e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

O resultado obtido no ensaio F1 2,4 g/L, não se voltou a repetir porque neste caso o extracto foi suplementado com adição simultânea de sais o que pode indicar uma possível efeito negativo sobre a produção da adição simultânea de sais.

**Tabela 12 – Concentração de açúcares no final dos ensaios efectuados com residuo L e extracto S 40 suplementados com fosfato de potássio e sulfato de amónia.**

| Ensaio | Xilose (g/L) | Frutose (g/L) | Glucose (g/L) | CB (g/L) |
|--------|--------------|---------------|---------------|----------|
| A2     | 0,085        | 2,393         | 1,701         | 0,996    |
| B2     | 0,070        | 2,475         | 2,243         | 1,060    |
| C2     | 0,084        | 1,737         | 1,777         | 1,160    |
| D2     | 0,091        | 2,456         | 1,597         | 1,060    |
| E2     | 0,089        | 2,495         | 1,741         | 1,024    |
| F2     | 0,064        | 2,477         | 1,962         | 0,984    |
| G2     | 0,083        | 2,340         | 1,671         | 1,046    |
| H2     | 0,083        | 1,847         | 1,576         | 1,148    |
| I2     | 0,067        | 2,037         | 1,737         | 1,078    |
| I2.1   | 0,073        | 2,110         | 1,370         | 1,012    |
| I2.2   | 0,065        | 2,109         | 1,783         | 1,108    |

Dos resultados da Tabela 12 verifica-se tal como nos ensaios anteriores que a fonte preferencialmente consumida foi a glucose. Por outro lado a quantidade de açúcar consumida foi semelhante para todos os ensaios confirmando o que se verificou para a CB produzida apesar das diferentes concentrações de sais adicionadas.

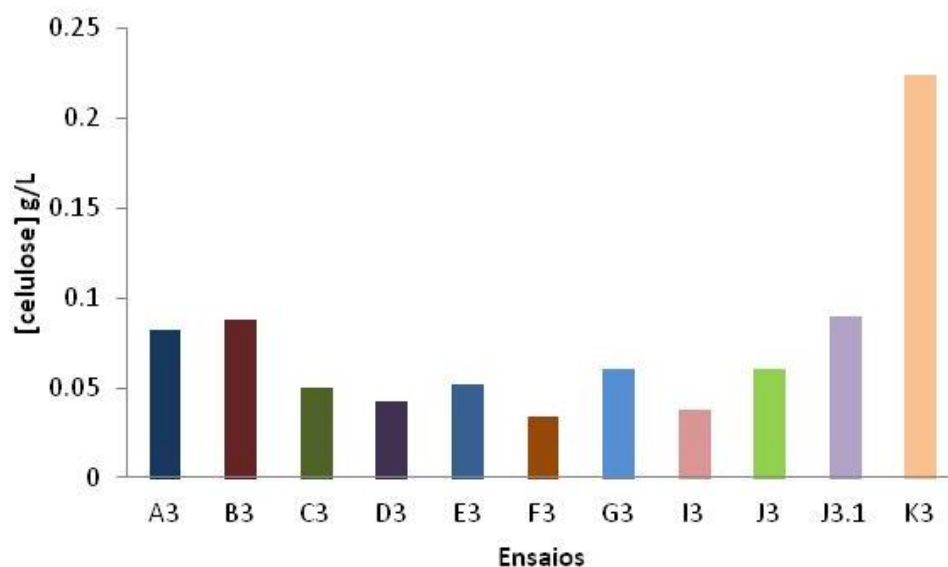
#### **4.1.4. Planeamentos experimentais de 24 e 60 horas**

Dado o resultado inconclusivo obtido no planeamento anterior colocou-se a hipótese de poder estar a ocorrer algum tipo de limitação nutricional que impedisse um aumento da produção de CB com a suplementação do resíduo. De facto, se algum outro nutriente essencial se esgotasse, mesmo existindo carbono, azoto ou fósforo, antes das 96 horas de tempo de cultura a produção de CB poderia abrandar ou mesmo parar. Isto significa que outra variável não contabilizada estaria a influenciar o processo de produção, prejudicando o planeamento experimental. Por isso, decidiu-se realizar mais dois ensaios, um com duração de 24 horas e outro com duração de 60 horas.

Paralelamente realizou-se um ensaio de produção com o extracto S 40 sem adição de sais com tempos de cultura de 24, 32, 48, 56, 72 e 96 horas de modo a seguir detalhadamente a produção de CB. Os ensaios efectuados, descritos na Tabela 5 e



Tabela 6 na secção 3.4.2.2.3 dos Materiais e Métodos apresentam-se na Figura 21 e Figura 22..



**Figura 21 – Quantidades de CB produzidas durante os ensaios do planeamento experimental de 24 horas.**

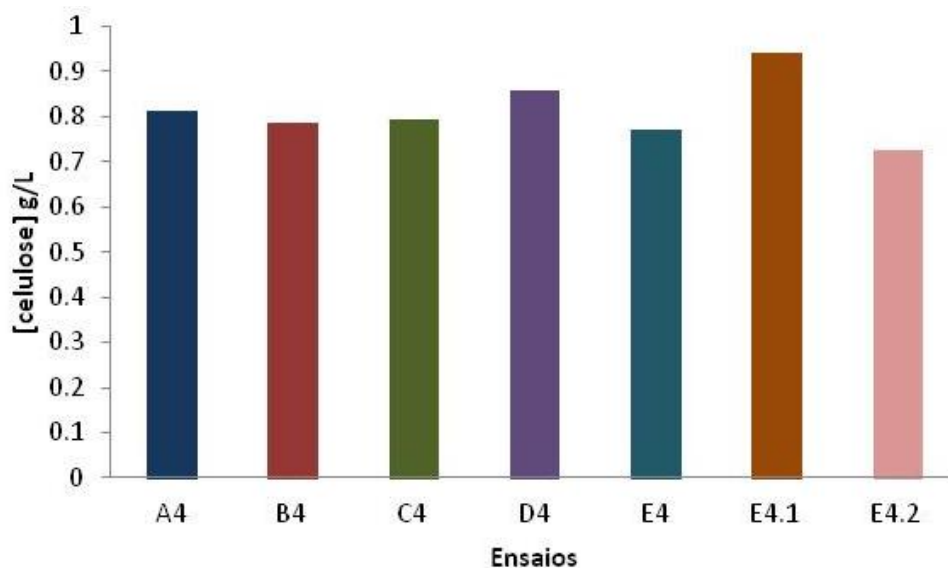
Os resultados obtidos na Figura 21 mostram que a produção de CB utilizando o extracto S 40, para diferentes concentrações de sais, se situou num valor médio de  $0,06 \pm 0,004$  g/L, sendo os mais elevados obtidos para os ensaios B3 e I3.1, respectivamente 0.088 g/L e 0.09 g/L. Este valor como se esperaria é inferior ao obtido ao fim de 96 horas, visto que as bactérias não tiveram tempo suficiente para produzir diferentes quantidades de CB, pois a quantidade de açúcares consumidos foi baixa (Tabela 13). No entanto, verificou-se que a relação da produção de CB entre as amostras contendo o substrato real e o meio HS (J) apesar do tempo reduzido de cultura, foi de 1:4 visto que a produção no meio rico (J) foi de 0,22 g/L. Isto poderá ser explicado pelo facto do período de 24 h escolhido, embora fosse suficiente para já ocorrer alguma produção de CB os microrganismos ainda poderiam estar na fase de adaptação como se verificou no trabalho de Carreira *et al.* [70].

**Tabela 13 – Concentração de açúcares no final dos ensaios do planeamento de 24 horas.**

| Ensaio | Xilose g/L | Frutose g/L | Glucose g/L | CB g/L |
|--------|------------|-------------|-------------|--------|
| A3     | 0,039      | 1,170       | 8,245       | 0,082  |
| B3     | 0,027      | 1,071       | 7,207       | 0,088  |
| C3     | 0,035      | 1,337       | 7,958       | 0,050  |
| D3     | 0,031      | 1,314       | 8,314       | 0,042  |
| E3     | 0,036      | 1,071       | 7,207       | 0,052  |
| F3     | 0,029      | 1,176       | 7,973       | 0,034  |
| G3     | 0,031      | 1,104       | 7,294       | 0,060  |
| H3     | 0,037      | 1,343       | 7,912       | 0,038  |
| I3     | 0,037      | 1,125       | 7,261       | 0,060  |
| I3.1   | 0,039      | 1,314       | 7,906       | 0,090  |

Os resultados apresentados na Tabela 13 mostram uma vez mais que a fonte maioritariamente consumida foi a glucose, embora com menor consumo da mesma devido ao tempo de cultura de apenas 24 horas, um curto espaço de tempo durante o qual as bactérias consumiram pouco açúcar.

Em relação ao planeamento experimental de 60 horas, os resultados obtidos são que se apresentam na Figura 22.



**Figura 22 - Quantidades de CB produzidas durante os ensaios do planeamento experimental de 60 horas.**

Os resultados deste planeamento experimental não mostraram uma melhoria significativa da adição de sais ao extracto S 40 de modo a ocorrer um aumento significativo da produção de CB.

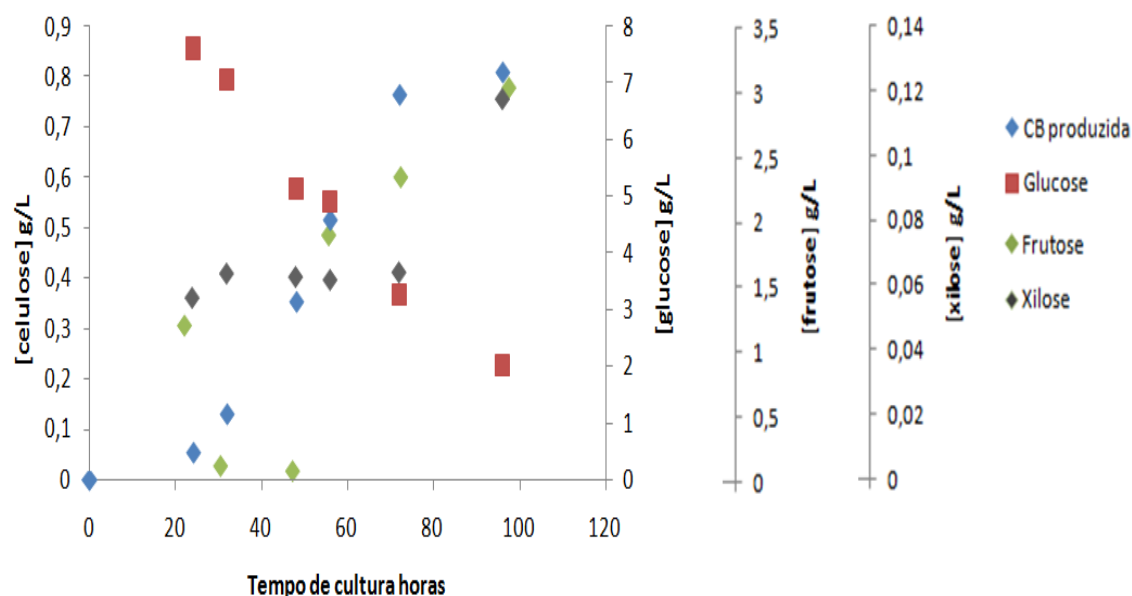
**Tabela 14 – Concentração de açúcares e de CB no final dos ensaios do planeamento de 60 horas.**

| Ensaio | Xilose g/L | Frutose g/L | Glucose g/L | CB g/L |
|--------|------------|-------------|-------------|--------|
| A4     | 0,047      | 1,696       | 2,223       | 0,814  |
| B4     | 0,042      | 1,452       | 2,104       | 0,786  |
| C4     | 0,039      | 1,511       | 1,851       | 0,792  |
| D4     | 0,038      | 1,567       | 2,340       | 0,860  |
| E4     | 0,036      | 1,237       | 1,830       | 0,770  |
| E4.1   | 0,039      | 1,248       | 1,308       | 0,942  |
| E4.2   | 0,038      | 1,679       | 2,715       | 0,726  |

A quantificação dos açúcares apresentada na Tabela 14 confirma a preferência dos microrganismos pela glucose. Tal como esperado consumiram-se mais açúcares durante estes ensaios em relação aos ensaios de 24h e consequentemente aumento o valor de CB produzida, situando-se num valor médio de  $0,81 \pm 0,029$  g/L indicando que às 60h o processo estaria na sua velocidade máxima.

Após a realização deste ensaio a 60 horas voltou-se a aplicar o modelo experimental utilizando os resultados dos planeamentos 24, 60 e 96 horas o que deu uma correlação de 96%. Neste caso o modelo ajustou bem porque o factor que varia é o tempo e sabemos que com o tempo a produção de CB evolui de uma forma gradual, por isso é que o modelo ajustou bem.

Para ter uma visão global da produção de CB e do consumo dos açúcares presentes no resíduo seguiu-se a evolução da curva de produção de CB ao longo do tempo de operação a partir do resíduo S40. Os resultados obtidos permitiram confirmar as hipóteses colocadas durante os conjuntos de ensaios correspondentes às 24, 60 e 96 h e apresentam-se na Figura 23 e na Tabela 15.



**Figura 23 – Evolução da quantidades de CB produzidas e de açúcares consumidos durante a produção CB com S 40.**

Os resultados obtidos mostram que a produção de CB aumentou ao longo do tempo de incubação. Considerando que existiu uma fase lag até perto das 24 horas, a partir deste tempo, a quantidade de CB produzida aumentou até às 72 horas, entrando nesta altura em fase de desaceleração, provavelmente devido à falta de algum nutriente pois ainda existiam açúcares no meio. Devido aos resultados obtidos anteriormente pode especular-se que também não terá sido falta de fonte de azoto ou de fósforo que condicionou o resultado obtido no planeamento de experiências de 96 h, mas provavelmente outro nutriente não identificado.

**Tabela 15 – Concentração de açúcares e de CB durante o ensaio de produção com S 40 sem sais.**

| Ensaio | Xilose g/L | Frutose g/L | Glucose g/L | CB g/L |
|--------|------------|-------------|-------------|--------|
| P 24   | 0,057      | 1,266       | 7,602       | 0,052  |
| P 32   | 0,065      | 0,193       | 7,041       | 0,130  |
| P 48   | 0,064      | 0,154       | 5,124       | 0,354  |
| P 56   | 0,063      | 1,956       | 4,888       | 0,516  |
| P 72   | 0,065      | 2,399       | 3,243       | 0,764  |
| P 96   | 0,120      | 3,082       | 2,000       | 0,810  |

Durante este ensaio o substrato principal a ser consumido foi a glucose e praticamente não houve consumo de xilose ou frutose (Tabela 15). O consumo da

glucose acompanhou a produção de CB. A glucose foi mais lentamente consumida, quando a produção de CB foi mais lenta, e a sua velocidade de consumo aumentou quando aumentou a velocidade de produção. Estes resultados confirmaram as hipóteses levantadas a partir dos resultados dos planeamentos experimentais de 24, 60 e 96 horas. Que às 96h o processo já estaria em fase estacionária talvez devido a alguma limitação nutricional e que às 24h estaria ainda a sair da fase lag.

A evolução temporal da produção de CB com base no consumo dos açúcares presentes no S40 confirma é semelhante à observada por Carreira et al. [70] utilizando meio HS contendo glucose, embora no caso destes autores a fase lag foi mais longa (até às 36h) e ocorreu uma maior produção de CB.

Nesta experiência verificou-se ainda um aumento das concentrações de xilose e sobretudo de frutose a partir das 48 h. Isto pode significar que o próprio microrganismo estaria a conseguir hidrolisar polissacáridos que não foram degradados no tratamento do resíduo. Verificou-se ainda no final dos vários ensaios a presença de galactose nas amostras analisadas por HPLC. De acordo com a caracterização feita pelo fornecedor do resíduo S, este tem uma fracção lenhocelulósica considerável não só composta por açúcares mas também por outros compostos que podem ser inibitórios para o crescimento microbiano como compostos fenólicos ou ácido acético. O facto de o microrganismo conseguir obter frutose, xilose e, provavelmente, glucose desta fracção também pode ter promovido o aumento de compostos tóxicos para o seu metabolismo e portanto ter contribuído para uma menor produção de CB em relação ao meio HS.

Embora não existam na literatura informações enzimas hidrolíticas de *G. sacchari*, este estudo foi feito para uma outra bactéria do mesmo género, *G. diazotrophicus* com 97.9-98.5 % de similaridade [71]. *G. diazotrophicus* tem a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas capazes de degradar as hemicelulose das paredes celulares das plantas entre as quais a endoglucanase, endopolimethilpoligacturonase e endoxiloglucanase [72]. Devido à similaridade existente, poderão existir estas enzimas em *G. sacchari* e por isso, a componente lenhocelulósica do resíduo utilizado poderá ser hidrolisada por acção desta bactéria. Esta hipótese poderia explicar o aparecimento da galactose no final dos ensaios assim o aumento das concentrações de frutose e xilose. Este processo de hidrólise, a ocorrer, poderá originar o aparecimento de compostos inibitórios para o microrganismo.

Os ensaios efectuados de acordo com o planeamento de experiências não permitiram determinar uma relação entre a produção de CB e a presença de sais de azoto e fósforo como tinha sido observado no trabalho de Carreira et al. [70].

#### 4.1.5. Produção de CB a partir do resíduo S após diferentes métodos de extracção

Uma vez que a aplicação do modelo experimental não correu como o esperado, colocando-se a hipótese de ter ocorrido uma hidrólise incompleta do resíduo S a 40°, testaram-se dois métodos de obtenção de açúcares adicionais: extracção aquosa a 100 °C (S100) e uma hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M (S H).

##### 4.1.5.1. Caracterização dos extractos

As composições em açúcares dos vários hidrolisados do resíduo S apresentam-se na Tabela 16.

**Tabela 16 – Concentração de açúcares presentes nos extractos obtidos a partir do resíduo S.**

|              | Açúcares totais (g/L) | Xilose (g/L) | Frutose (g/L) | Glucose (g/L) | Arabinose (g/L) | Manose (g/L) | Galactose (g/L) |
|--------------|-----------------------|--------------|---------------|---------------|-----------------|--------------|-----------------|
| <b>S 40</b>  | 11,83                 | 0,27         | 1,55          | 10,01         | -----           | -----        | -----           |
| <b>S 100</b> | 11,91                 | 0,25         | 1,65          | 10,01         | -----           | -----        | -----           |
| <b>S H</b>   | 10,81                 | 3,72         | 0,68          | 4,53          | 1,88            | -----        | -----           |

Embora tenha sido utilizada uma temperatura mais elevada, verificou-se que a quantidade de açúcares redutores totais obtida a 100°C foi semelhante à obtida a 40°C, 11,91 g/L e 11,83 g/L, respectivamente. Além disso a composição dos dois extractos é semelhante: xilose, frutose e glucose, estando este último em maior quantidade. A utilização de ácido, ou seja um método mais agressivo, levou à obtenção de uma menor quantidade de açúcares com a mesma composição que S 40 e S 100 com a presença adicional da arabinose. A agressividade do método terá resultado na degradação pelo ácido dos açúcares presentes.

#### 4.1.5.2. *Produção de CB a partir dos extractos*

Procedeu-se então a um conjunto de ensaios com os diferentes extractos obtidos como substrato para a produção de CB anteriormente de modo a verificar a influência de diferentes métodos de extracção. Em paralelo também foi testada a utilização dos extractos com a adição dos componentes do meio de referência HS. Os ensaios efectuados, descritos na Tabela 8 na secção 3.4.2.2.3 dos Materiais e Métodos, tiveram a duração de 96 horas e os resultados apresentam-se na Figura 24.

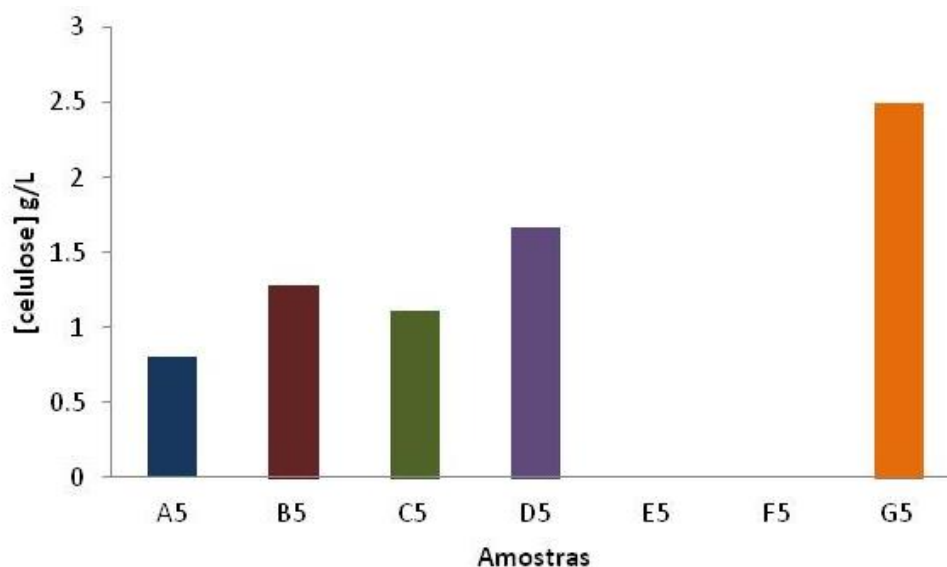


Figura 24 – Quantidades de CB produzidas a partir dos extractos do resíduo S obtidos por diferentes métodos de hidrólise.

Pelos resultados obtidos verificou-se que ocorreu um ligeiro aumento da produção de CB quando se compara o valor obtido a partir de S 40 (A5) com o a partir de S 100 (C5), de 0,81 g/L para 1,12 g/L, respectivamente nas experiências sem suplementação de nutrientes. Como os dois resíduos tinham uma composição em açúcares semelhante, as diferenças na quantidade de CB produzida poderão ter resultado do facto do extracto S 100 ter sido obtido a uma temperatura superior e por isso ter sido extraído em maior quantidade de um composto que favorecesse a produção de CB ou ter sido degradado algum componente do resíduo que inibisse o comportamento de *G. sacchari*.

A adição de componentes do meio HS aos extractos S 40 e S 100 (ensaios B5 e D5, respectivamente), verifica-se que ocorreu um aumento da quantidade CB produzida de 0,81 g/L (A5) para 1,28 g/L (B5) e 1,12 g/L (C5) para 1,60 g/L (D5). Este aumento

relacionou-se com a adição dos nutrientes, pois estes são necessários para suprir as necessidades nutricionais das bactérias para produzir CB, confirmando-se o que já tinha sido observado anteriormente. No entanto, a produção de CB em D5 quando comparada com o meio HS (G5) foi inferior, 1.6 g/L *versus* 2.5 g/L, respectivamente, mas é de referir que em G5 a quantidade de glucose foi o dobro. O hidrolisado S H com (F5) e (E5) sem componentes do meio HS não produziu qualquer CB. Embora o hidrolisado possua uma quantidade de açúcares considerável (Tabela 16), a hidrólise ácida além de degradar a hemicelulose e outros componentes lenho-celulósicos, com a formação dos compostos tóxicos como compostos fenólicos referidos anteriormente, também degradou os açúcares formando-se furfurais (Figura 25) que poderão ter inibido o metabolismo das bactérias e por conseguinte a produção de CB.



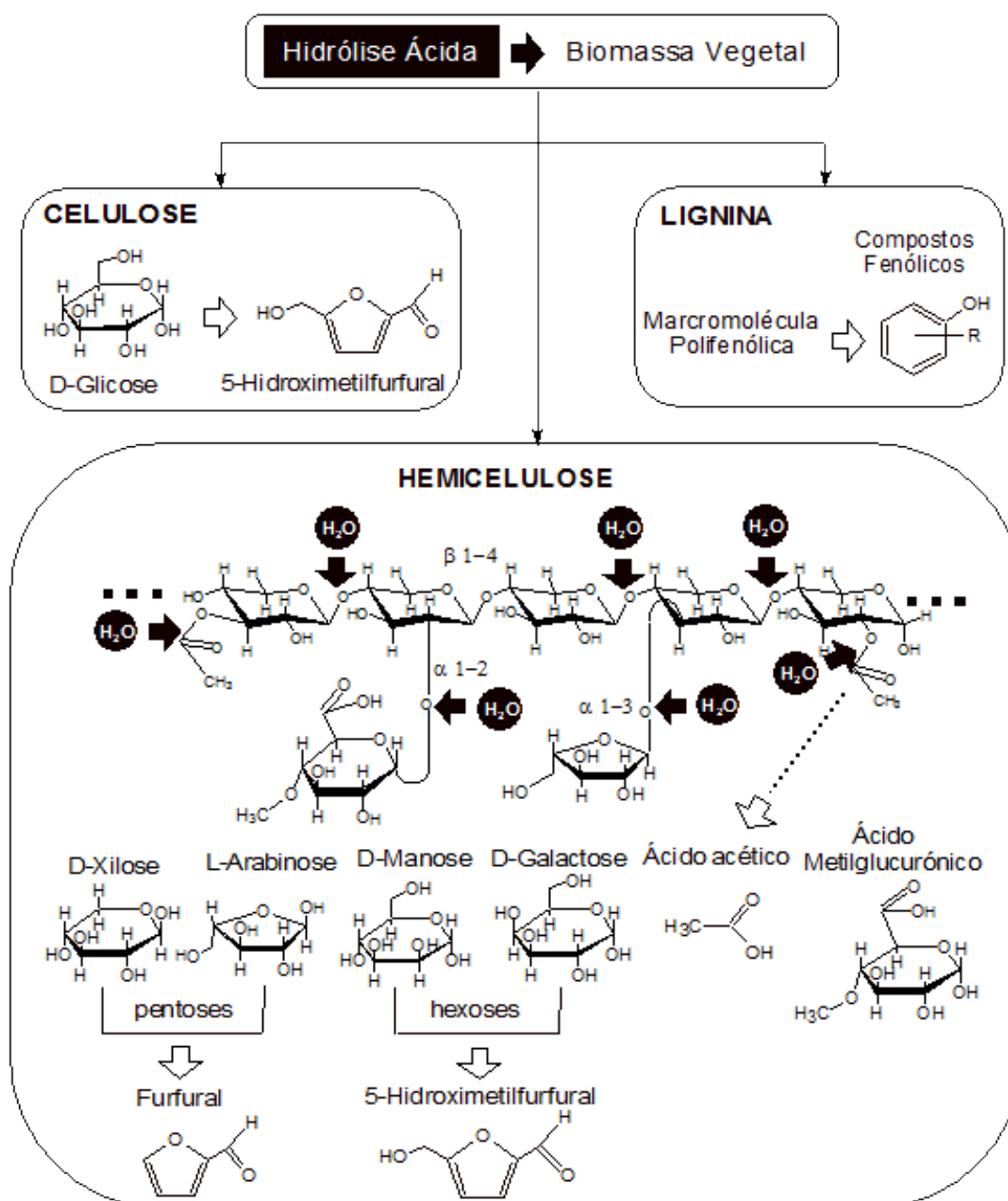


Figura 25 – Formação de compostos tóxicos para a bactéria *G. sacchari* [73].

Determinaram-se o rendimento e a produtividade do processo para os ensaios com S 40 e S 100 como substrato sem adição de nutrientes e comparou-se com o ensaio efectuado com meio HS e os resultados apresentam-se na Tabela 8. Escolheram-se os ensaios sem adição de nutrientes pois são estes o ponto de partida para uma optimização do processo perspectivando a sua implementação industrial e não os ensaios que representam um custo superior devido às fontes nutricionais dispendiosas utilizadas. Não se efectuaram estes cálculos para o ensaio com S H por não ter sido detectada a formação de CB.

Tabela 17 – Concentração de açúcares e de CB nos ensaios efectuados nos extractos.

| Ensaio     | Xilose (g/L) | Frutose (g/L) | Glucose inicial (g/L) | Glucose final (g/L) | CB (g/L) |
|------------|--------------|---------------|-----------------------|---------------------|----------|
| G5 (HS)    | -----        | -----         | 20,00                 | 2,00                | 2,50     |
| A5 (S 40)  | -----        | -----         | 10,01                 | 0,69                | 1,12     |
| C5 (S 100) | -----        | -----         | 10,01                 | 1,80                | 0,81     |

Tabela 18 – Produtividade e rendimento obtidos nos ensaios com os extractos S 40, S 100 e HS.

| Ensaio     | Si (g/L) | $\Delta$ CB (g/L) | $\Delta$ S (g/L) | $\alpha$ (%) | $Y_{CB/S}$ (g CB/g substrato) | $\Gamma_{CB}$ (g CB/L.h) |
|------------|----------|-------------------|------------------|--------------|-------------------------------|--------------------------|
| G5 (HS)    | 20,00    | 2,5               | 18,00            | 90           | 0,138                         | 0,026                    |
| A5 (S 40)  | 10,01    | 0,81              | 8,21             | 82           | 0,099                         | 0,008                    |
| C5 (S 100) | 10,01    | 1,10              | 9,32             | 93           | 0,118                         | 0,011                    |

Podemos concluir em todas as experiências, a glucose foi praticamente toda consumida, confirmando isso pelos graus de conversão obtidos 82, 90 e 93%. Em relação ao rendimento, verificou-se um rendimento ligeiramente superior para o meio mais rico (G5), 0.138 g CB/g substrato que nos meios reais, A5 e C5, respectivamente, 0.099 g CB/g substrato e 0,118 g CB/g substrato. A maior quantidade de CB produzida no meio que resultou de uma maior quantidade de substrato fornecido reflectiu-se no maior valor de produtividade.

Carreira *et al.* [70] utilizando o mesmo microrganismo obtiveram valores de produtividades em BC a partir de vários resíduos, entre 0,0013 e 0,005g CB/L.h, da mesma ordem de grandeza que os obtidos no presente trabalho experimental, 0,008 e 0,011g CB/L.h. Considerando os graus de conversão dos substratos, os valores de Carreira *et al.* [70], entre 5 e 30%, foram muito inferiores aos apresentados neste trabalho, 82 % e 90 %. Em termos de rendimentos em CB os valores obtidos no presente trabalho experimental foram ligeiramente inferiores aos obtidos por Carreira *et al.* [70], atingindo valores de 0,175g CB/g substrato.

## 4.2. ENSAIO COM AS BORRAS DE CAFÉ

Para este resíduo testaram-se como fonte de carbono as borras de café, nomeadamente Bora antes da extracção do óleo (borra obtida directamente do departamento de química), Ba, e a borra após extracção do óleo pelo método

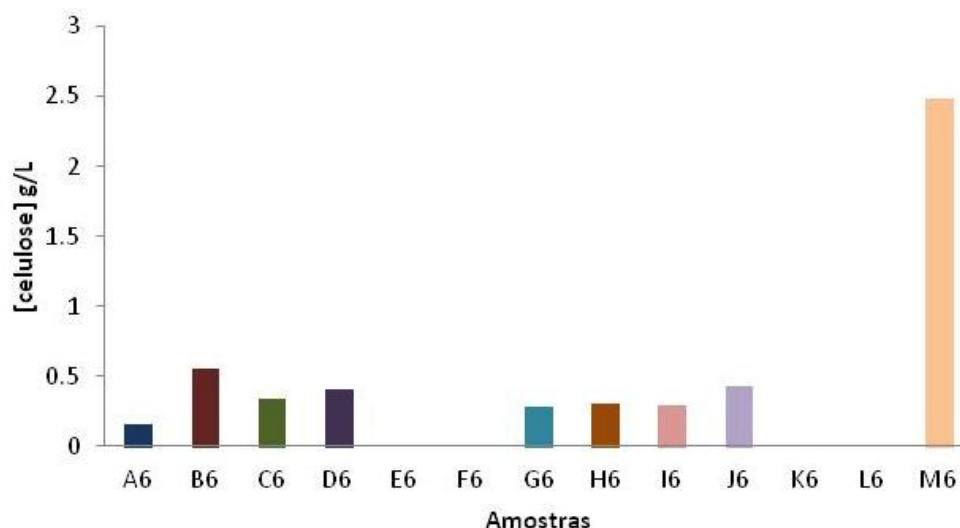
SOXHLET, Bd. Estes dois resíduos sólidos foram posteriormente submetidos aos métodos de extracção testados para o resíduo S, nomeadamente extracção aquosa a 40°C (Ba 40 e Bd 40) e a 100°C (Ba 100 e Bd 100) e hidrólise ácida a 100°C com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M (Ba H e Bd H). As composições destes extractos apresentam-se na Tabela 19.

**Tabela 19 – Açúcares presentes nos extractos dos resíduos Ba e Bd.**

|               | <b>Açúcares totais (g/L)</b> | <b>Xilose (g/L)</b> | <b>Frutose (g/L)</b> | <b>Glucose (g/L)</b> | <b>Arabinose (g/L)</b> | <b>Manose (g/L)</b> | <b>Galactose (g/L)</b> |
|---------------|------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|------------------------|---------------------|------------------------|
| <b>Ba H</b>   | 4,01                         |                     |                      |                      | 1,43                   | 1,25                | 1,33                   |
| <b>Bd 40</b>  | 0,634                        |                     | 0,016                | 0,14                 | 0,4                    | 0,078               |                        |
| <b>Bd 100</b> | 0,51                         |                     |                      | 0,26                 | 0,25                   |                     |                        |
| <b>Bd H</b>   | 1,95                         | 0,14                |                      |                      | 0,68                   | 0,75                | 0,38                   |

Não foi possível quantificar os açúcares presentes nos extractos aquosos do resíduo Ba a 40 e a 100°C, por HPLC, mas foi feita uma análise por DNS que revelou que deveriam ter uma concentração de açúcares entre 0.2-0.3 g/L. O hidrolisado Ba H tinha 4.01 g/L de açúcares. Os extractos aquosos Bd 40 e Bd 100 e hidrolisado Bd H têm uma concentração total em açúcares de 0.63, 0.51 e 1.95 g/L respectivamente. Estes valores são significativamente mais baixos que os obtidos para o resíduo da azeitona, embora a variedade de açúcares seja distinta. Os açúcares identificados nos extractos de borra de café e respectivos hidrolisados estão de acordo com a literatura [74].

Os ensaios efectuados, descritos na Tabela 9 na secção 3.4.2.4.1 dos Materiais e Métodos, e os resultados apresentam-se na Figura 26 e na Tabela 20



**Figura 26 – Quantidades de CB produzidas a partir dos resíduos Ba e Bd.**

Os resultados obtidos mostram uma diminuição da produção de CB com valores entre 0.16 g/L e 0.3 g/L com a utilização dos extractos da borra nos ensaios sem suplementação de nutrientes (A6, C6, G6 e I6) em relação aos obtidos com o resíduo da azeitona. Esta situação relaciona-se com a quantidade deficitária de açúcares extraídos na borra que pode ser verificado na Tabela 19. Nos ensaios com nutrientes do meio HS adicionados ao resíduo (B6, D6, H6 e J6), a quantidade de CB não foi muito superior, situando-se entre 0.3 g/L e 0.6 g/L, embora tenha uma vez mais ocorrido um ligeiro aumento de produção quando se compara com os extractos sem adição de nutrientes. Por outro lado tanto nos ensaios com os hidrolisados Ba H e Bd H, como nos ensaios com hidrolisados suplementados com os componentes do meio HS não se detectou formação de CB. Esta situação poderá estar relacionada com a eventual formação de compostos inibitórios para as bactérias tal como foi visto com o resíduo S.

**Tabela 20 – Concentração de açúcares e de CB no final dos ensaios com os resíduos Ba e Bd.**

| <b>Ensaio</b> | <b>Xilose<br/>(g/L)</b> | <b>Frutose<br/>(g/L)</b> | <b>Glucose<br/>(g/L)</b> | <b>Arabionose<br/>(g/L)</b> | <b>Manose<br/>(g/L)</b> | <b>Galactose<br/>(g/L)</b> | <b>CB<br/>(g/L)</b> |
|---------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------|
| A6            |                         | 0,044                    | 0,230                    |                             |                         |                            | 0,162               |
| B6            | 0,100                   | 0,280                    |                          |                             |                         |                            | 0,558               |
| C6            |                         | 0,029                    | 0,170                    |                             |                         |                            | 0,338               |
| D6            |                         |                          |                          | 0,110                       | 0,290                   |                            | 0,406               |
| E6            |                         |                          |                          | 0,990                       | 0,810                   |                            | 0,000               |
| F6            |                         |                          |                          | 1,230                       | 0,570                   |                            | 0,000               |
| G6            |                         |                          |                          | 0,130                       |                         |                            | 0,278               |
| H6            |                         |                          |                          |                             |                         |                            | 0,306               |
| I6            |                         |                          |                          | 0,071                       |                         |                            | 0,298               |
| J6            |                         |                          |                          | 0,050                       |                         |                            | 0,434               |
| K6            |                         |                          |                          | 0,200                       | 0,690                   |                            | 0,000               |
| M6            |                         |                          |                          | 0,230                       | 0,500                   | 0,150                      | 0,000               |

A fraca produção de CB está relacionada com a baixa presença de açúcares nos extractos aquosos obtidos. Além disso, ensaios realizados com adição de fontes de azoto e fonte de fósforo tiveram um efeito negativo na produção de CB a partir dos extractos aquosos Ba 40, Ba 100, Bd 40 e Bd 10, ocorrendo apenas uma produção muito baixa, não quantificável.

Os dados obtidos não são suficientes para concluir que a borra de café não é um bom substrato para *G. sacchari* produzir CB. Indicam apenas que é necessário testar outros métodos de extracção para conseguir obter os açúcares presentes neste resíduo.

### 4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS MANTAS DE CB

#### 4.3.1. FTIR

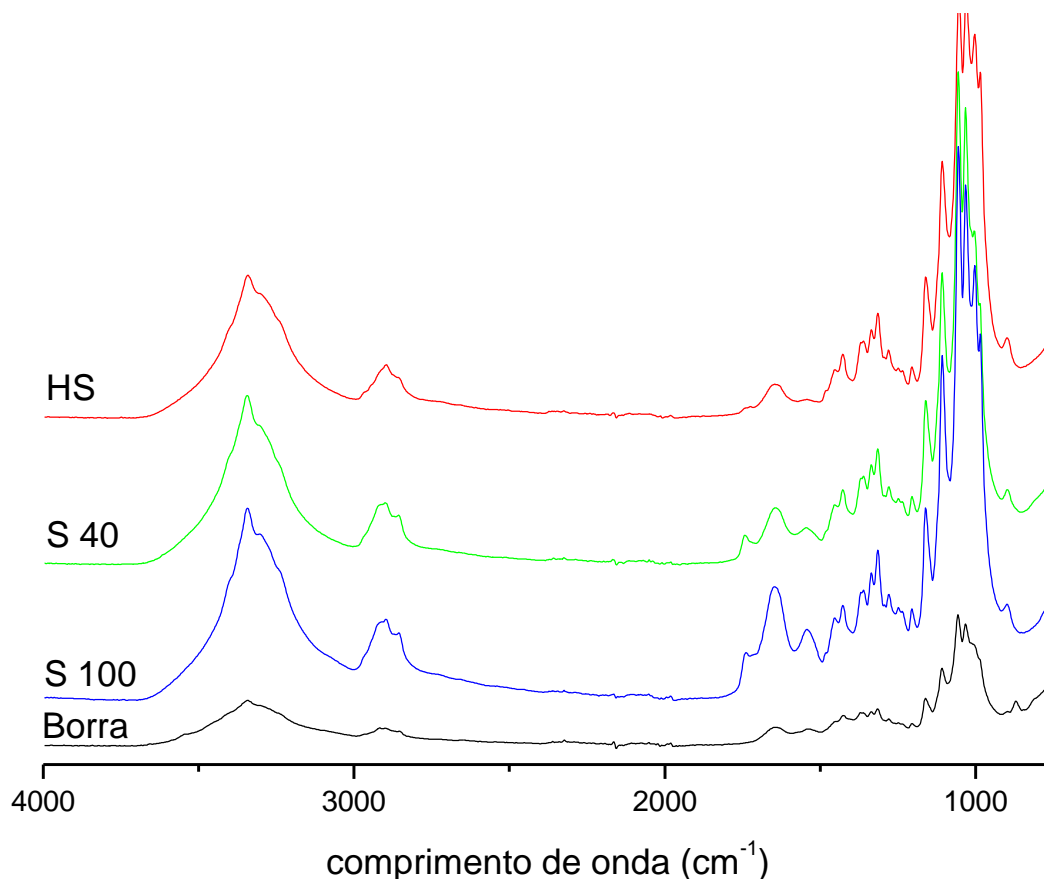
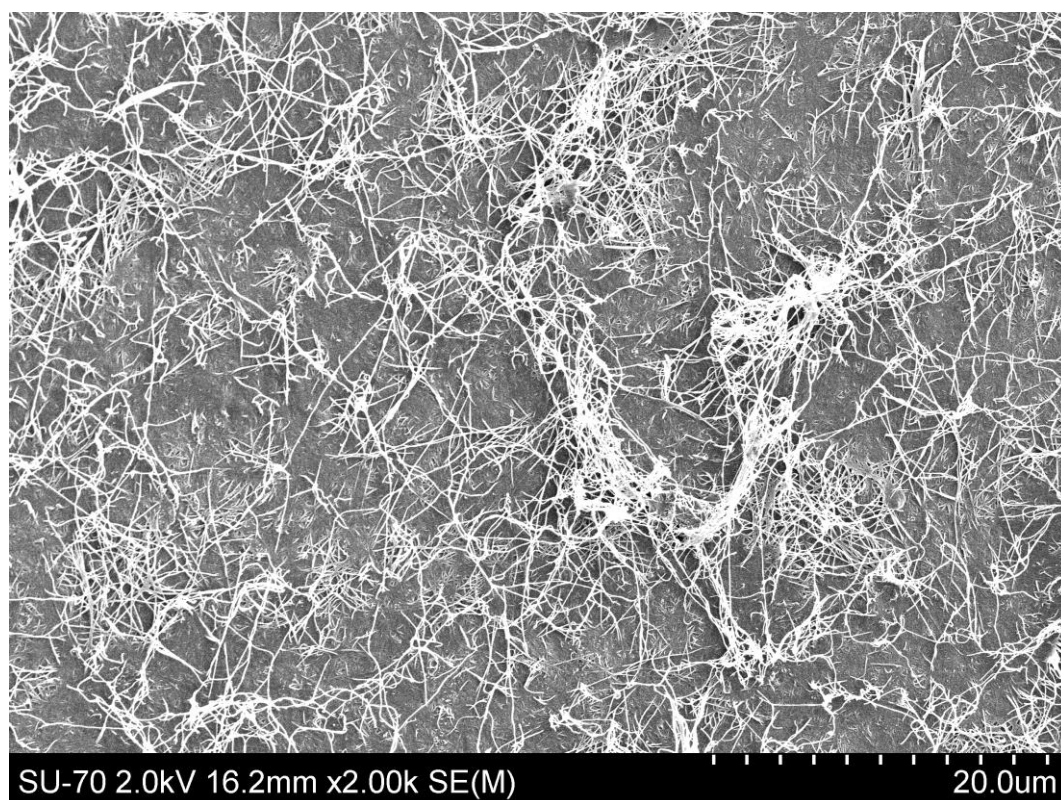


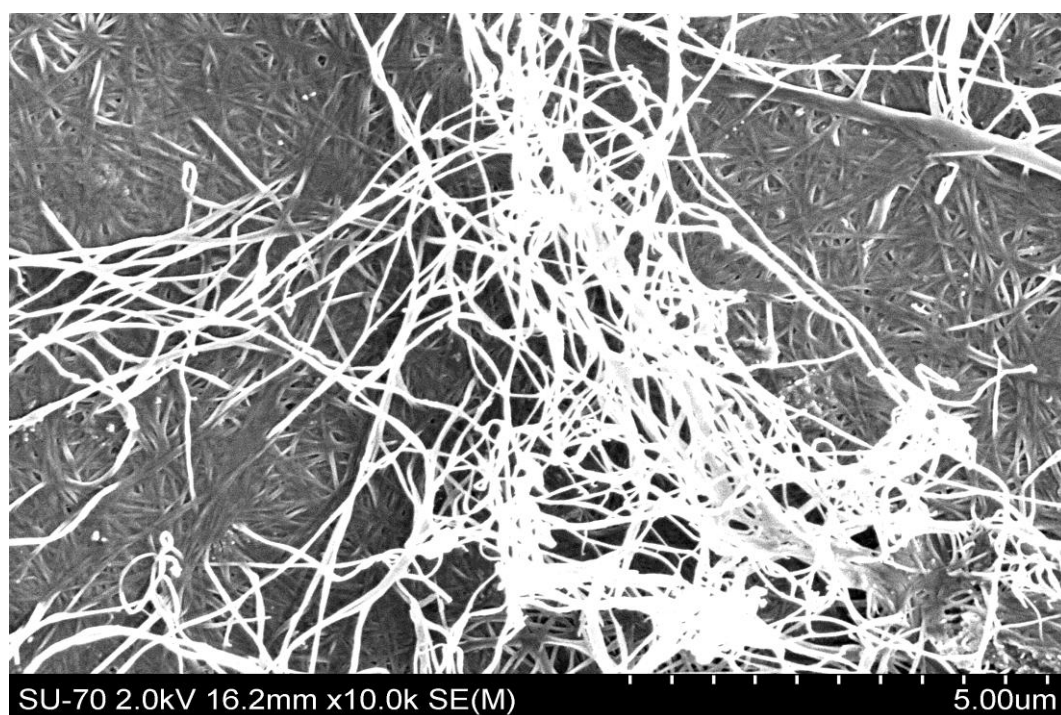
Figura 27 – Espectros de FTIR obtidos para os Resíduos utilizados e meio referência HS.

Todos os espectros de FTIR das membranas de CB produzidas tanto com o meio de referência HS, como os extractos aquosos do bagaço extractado seco e da borra apresentam os picos vibracionais característicos da celulose, a  $3300\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes as vibrações dos grupos OH, a  $2880\text{ cm}^{-1}$  correspondente às vibrações das ligações C-H e a  $1100\text{ cm}^{-1}$  que são típicos da vibração dos grupos C-O-C. Por outro lado, esta técnica também permitiu confirmar que o processo de lavagem e purificação das mantas de CB foi bem sucedido uma vez que não foram detectados picos vibracionais adicionais que não sejam os relativos à CB.

### **4.3.2. SEM**



**Figura 28 – Imagem de SEM produzida pelo extracto S 40 16.2mmx2.0K 20.0 um**



**Figura 29 – Imagem de SEM do extracto S 40 16.2 mm x 10.0K 5 um.**



**Figura 30 – Imagem SEM do extracto S 40 16.2mm x 18.0K 3.00 um.**

As imagens obtidas por SEM comprovaram a estrutura tridimensional de nano e microfibrilas característica da CB, bem como uma vez mais a ausência de contaminantes, não existindo diferenças entre as mantas produzidas pelos diferentes resíduos.





## 5. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

Neste trabalho testaram-se resíduos industriais, da indústria de produção de azeite e da torrefacção de café como substratos para a produção de celulose bacteriana. Os resíduos da indústria da produção de azeite fornecido a *Gluconacetobacter sacchari* foram os extractos de bagaço e caroço e o bagaço extractado seco (S). Após ensaios preliminares decidiu-se utilizar o extracto aquoso do bagaço extractado seco, por ser o que conduziu a uma maior quantidade de CB e estudou-se o efeito na produção suplementação com sais sulfato de amónia e de fosfato de potássio. Após resultados iniciais promissores decidiu-se aplicar um modelo de planeamento experimental com adição simultânea de sais. Pelos resultados obtidos verificou-se a impossibilidade de aplicar o modelo pois verificou-se que não existia uma relação directa entre a produção de CB e adição de sais como se tinha verificado em trabalhos anteriores em que se utilizaram resíduos diferentes [70]. Testaram-se ainda diferentes métodos de extracção (com água a 40°C e 100°C e com ácido sulfúrico) e todos permitiram obter uma concentração de açúcares superior a 10 g/L, maioritariamente compostos por glucose e com frutose e xilose em menor quantidade.

Nos ensaios com o resíduo S, obtiveram-se resultados significativos com os extractos aquosos S40 e S100, com produções de CB de 0,81 g/L e 1,12 g/L, respectivamente. Estes valores, embora mais baixos que os obtidos com o meio de referência HS, 2,5 g/L, são considerados promissores uma vez que se tratam de resíduos sem qualquer suplementação nutricional. Os valores de produtividade, grau de conversão de substrato com estes extractos foram bastante significativos quando comparados com os valores obtidos até ao momento na literatura [70]. Estes valores máximos de CB obtidos neste trabalho foram, até ao momento, o valor mais elevado de CB até ao momento num processo utilizando resíduos industriais e a bactéria *G. sacchari*.

Neste trabalho também foi testada a borra de café. Sendo um resíduo sólido procedeu-se à extracção dos açúcares utilizando métodos utilizados com o resíduo S. Obtiveram-se extractos com baixas concentrações de açúcar e distintas composições, não existindo um açúcar predominante. Os resultados obtidos de produção de CB, foram muito baixos e podem ser explicados pela baixa concentração de açúcares

presentes nos extractos. Além disso, a partir dos extractos obtidos após hidrólise ácida não se observou qualquer produção de CB, possivelmente devido à possível extracção/formação de compostos tóxicos paras as bactérias.

A formação de compostos tóxicos também poderá ter afectado o rendimento observado nos restantes extractos de borra de café e de bagaço seco de azeitona. Por isso como trabalho futuro sugere-se que se estudem mais detalhadamente os métodos de extracção de açúcares dos resíduos testados neste trabalho, como o uso de diferentes proporções de resíduo sólido para volume de líquido. Outros processos de extracção deverão ser estudados como por exemplo hidrólise básica ou utilizando enzimas hidrolíticas. Além disso também deve ser estudado a utilização de passos de pré-tratamento físico do resíduo antes da extracção como se costuma utilizar em resíduos lenhocelulósicos com pressão ou vapor de modo a aumentar a quantidade de açúcares obtidos. Também será importante tentar adaptar *G. sacchari* ao resíduo utilizado de modo a que seja menos sensível à presença de compostos tóxicos extraídos juntamente com os açúcares e conseguir compreender alguns dos seus mecanismos internos, como por exemplo, a relação entre a produção de CB e o crescimento, de modo a aumentar a produtividade do processo. Por esta razão torna-se necessário, no futuro, estabelecer um método para a quantificação da biomassa ao longo da produção de CB. Finalmente a implementação do processo em reactor é essencial para o seu sucesso no futuro.

Como conclusão final, neste trabalho utilizaram-se resíduos produzidos em grande escala a nível industrial que constituem um problema ambiental e consequentemente a sua eliminação acarreta um custo elevado para as empresas. Neste trabalho desenvolveu-se uma forma de valorizar estes resíduos através da produção de um biomaterial com propriedades únicas como a celulose bacteriana. Ao mesmo tempo, o facto de se utilizarem substratos baratos contribui-se para a diminuição do custo de produção da CB e, consequentemente, do seu preço final. Neste trabalho houve um esforço para valorizar resíduos da indústria nacional, como a produção de azeite ou da torrefacção de café, contribuindo para o desenvolvimento da economia nacional com a criação de uma linha de produção de um novo produto. A diversificação dos produtos industriais além de aumentar a rentabilidade das empresas pode também resultar na criação de mais empregos.

## REFERÊNCIAS

1. El-Saied, H.E.-D., A. I.Basta, A. H. Atwa, N. A. El-Ghwas, D. E., *Production and Characterization of Economical Bacterial Cellulose*. Bioresources, 2008. **3**(4): p. 1196-1217.
2. Klemm, D.H., B.Fink, H. P.Bohn, A., *Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material*. Angewandte Chemie-International Edition, 2005. **44**(22): p. 3358-3393.
3. Pecoraro, E., D. Manzani, Y. Messaddeq, and S.J.L. Ribeiro, *Bacterial Cellulose from Gluconacetobacter xylinus: Preparation , Properties and Applications, in Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. 2008: ELSEVIER: Amsterdam.
4. Keshk, S.M.A.S. and K. Sameshima, *Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production*. African Journal of Biotechnology, 2005. **4**(6): p. 478-482.
5. Keshk, S.M.A.S., T.M.A. Razek, and K. Sameshima, *Bacterial cellulose production from beet molasses*. African Journal of Biotechnology, 2006. **5**(17): p. 1519-1523.
6. Mohan, D., C.U. Pittman, and P.H. Steele, *Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review*. Energy & Fuels, 2006. **20**(3): p. 848-889.
7. Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman, *Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria*. Microbiological Reviews, 1991. **55**(1): p. 35-58.
8. Krässig, H.A., *Cellulose - Structure, Accessibility and Reactivity*. 1993: Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers.
9. Brown, R.M., *Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century?* Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry, 2004. **42**(3): p. 487-495.
10. Brown, A.J., *XLIII-On an Acetic Ferment which form Cellulose*. Journal of the Chemical Society, 1886. **49**: p. 432-439.
11. Garrity, G.M.B., Don J.; Krieg, Noel R.; Staley, James R, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. *The Proteobacteria*, ed. M. Springer. Vol. vol. 2. 2005, East Lansing,: ed. G.M. Garrity.
12. Chawla, P.R.B., I. B.Survase, S. A.Singhal, R. S., *Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications*. Food Technology and Biotechnology, 2009. **47**(2): p. 107-124.
13. Grometelhanan, Z. and S. Hestrin, *Synthesis of Cellulose by Acetobacter Xylinum .6. Growth on Citric Acid-Cycle Intermediates*. Journal of Bacteriology, 1963. **85**(2): p. 284-&.
14. Park, J.K., J.Y. Jung, and Y.H. Park, *Cellulose production by Gluconacetobacter hansenii in a medium containing ethanol*. Biotechnology Letters, 2003. **25**(24): p. 2055-2059.
15. Yoshino, T., T. Asakura, and K. Toda, *Cellulose production by Acetobacter pasteurianus on silicone membrane*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996. **81**(1): p. 32-36.
16. Trovatti, E.S., Luisa S. Freire, Carmen S. R. Silvestre, Armando J. D. Neto, Carlos Pascoal, *Gluconacetobacter sacchari: An efficient bacterial cellulose cell-factory*. Carbohydrate Polymers, 2011. **86**(3): p. 1417-1420.

17. Hong, F. and K.Y. Qiu, *An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain Acetobacter aceti subsp xylinus ATCC 23770*. Carbohydrate Polymers, 2008. **72**(3): p. 545-549.
18. Helenius, G.B., H. Bodin, A. Nannmark, U. Gatenholm, P. Risberg, B., *In vivo biocompatibility of bacterial cellulose*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. **76A**(2): p. 431-438.
19. Zaar, K., *Biogenesis of Cellulose by Acetobacter Xylinum*. Cytobiologie, 1977. **16**(1): p. 1-15.
20. Yamanaka, S.W., K.Iguchi, M.Nishi, Y., *Production, property, and application of bacterial cellulose*. Nippon Nogeikagaku Kaishi-Journal of the Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry, 1998. **72**(9): p. 1039-1044.
21. Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M. and Kalinowska, H, *Bacterial Cellulose*. Biopolymers. Vol. 5. 2002, Munster, Germany: Wiley-VCH.
22. Jonas, R. and L.F. Farah, *Production and application of microbial cellulose*. Polymer Degradation and Stability, 1998. **59**(1-3): p. 101-106.
23. Linder, M. and T.T. Teeri, *The roles and function of cellulose-binding domains*. Journal of Biotechnology, 1997. **57**(1-3): p. 15-28.
24. Gelin, K.B., A. Gatenholm, P. Mihranyan, A. Edwards, K. Stromme, M., *Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy*. Polymer, 2007. **48**(26): p. 7623-7631.
25. Czaja, W.K., A.Bielecki, S.Brown, R. M., *Microbial cellulose - the natural power to heal wounds*. Biomaterials, 2006. **27**(2): p. 145-151.
26. Legge, R.L., *Microbial Cellulose as a Speciality Chemical*. Biotechnology Advances, 1990. **8**(2): p. 303-319.
27. Shah, J. and R.M. Brown, *Towards electronic paper displays made from microbial cellulose*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005. **66**(4): p. 352-355.
28. Budhiono, A.R., B.Taher, H.Iguchi, M., *Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system*. Carbohydrate Polymers, 1999. **40**(2): p. 137-143.
29. Ng, C.-C. and Y.-T. Shyu, *Development and production of cholesterol-lowering <i>Monascus</i>-nata complex*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004. **20**(9): p. 875-879.
30. Stephens, S.R., Westland, John A., Neogi, Amar N. , *Method of using bacterial cellulose as a dietary fiber component*. 1990.
31. Wan, W.a.L.M., *Hydrogel/cellulose composite material useful in designing and fabrication of medical devices e.g. stents, comprises preset amount of hydrogel, cellulose-fibers having nanometer scale cross-sectional dimensions and solvent, in WAN W (WANW-Individual) MILLON L (MILL-Individual)*. 2009.
32. Charpentier, P.A., A. Maguire, and W.K. Wan, *Surface modification of polyester to produce a bacterial cellulose-based vascular prosthetic device*. Applied Surface Science, 2006. **252**(18): p. 6360-6367.
33. Backdahl, H.H., G. Bodin, A. Nannmark, U. Johansson, B. R. Risberg, B. Gatenholm, P., *Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells*. Biomaterials, 2006. **27**(9): p. 2141-2149.
34. Wippermann, J.S., D. Klemm, D. Kosmehl, H. Satehi-Gelani, S. Wahlers, T., *Preliminary Results of Small Arterial Substitute Performed with a New Cylindrical Biomaterial Composed of Bacterial Cellulose*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2009. **37**(5): p. 592-596.

35. Zaborowska, M.B., A. Backdahl, H. Popp, J. Goldstein, A. Gatenholm, P., *Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(7): p. 2540-2547.
36. Maneerung, T., S. Tokura, and R. Rujiravanit, *Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing*. Carbohydrate Polymers, 2008. **72**(1): p. 43-51.
37. Surma-Slusarska, B., S. Presler, and D. Danielewicz, *Characteristics of Bacterial Cellulose Obtained from Acetobacter Xylinum Culture for Application in Papermaking*. Fibres & Textiles in Eastern Europe, 2008. **16**(4): p. 108-111.
38. Wu, S.C. and Y.K. Lia, *Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2008. **54**(3-4): p. 103-108.
39. Grande, C.J.T., Fernando G.Gomez, Clara M.Carmen Bañó, M., *Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications*. Acta Biomaterialia, 2009. **5**(5): p. 1605-1615.
40. Saibuatong, O.A. and M. Phisalaphong, *Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis*. Carbohydrate Polymers, 2010. **79**(2): p. 455-460.
41. Trovatti, E.O., LúciaFreire, Carmen S. R.Silvestre, Armando J. D.Pascoal Neto, CarlosCruz Pinto, José J. C.Gandini, Alessandro, *Novel bacterial cellulose–acrylic resin nanocomposites*. Composites Science and Technology, 2010. **70**(7): p. 1148-1153.
42. Hornung, M.L., M.Gerrard, A. M.Schmauder, H. P., *Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: Evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part I)*. Engineering in Life Sciences, 2006. **6**(6): p. 537-545.
43. Vandamme, E.J.D.B., S.Vanbaelen, A.Joris, K.De Wulf, P., *Improved production of bacterial cellulose and its application potential*. Polymer Degradation and Stability, 1998. **59**(1-3): p. 93-99.
44. Rivas, B.M., A. B.Dominguez, J. M.Parajo, J. C., *Development of culture media containing spent yeast cells of Debaryomyces hansenii and corn steep liquor for lactic acid production with Lactobacillus rhamnosus*. International Journal of Food Microbiology, 2004. **97**(1): p. 93-98.
45. Chao, Y., Y. Sugano, and M. Shoda, *Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001. **55**(6): p. 673-679.
46. Oikawa, T., T. Ohtori, and M. Ameyama, *Production of Cellulose from D-Mannitol by Acetobacter-Xylinum Ku-1*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1995. **59**(2): p. 331-332.
47. Son, H.J.K., H. G. Kim, K. K. Kim, H. S. Kim, Y. G. Lee, S. J., *Increased production of bacterial cellulose by Acetobacter sp V6 in synthetic media under shaking culture conditions*. Bioresource Technology, 2003. **86**(3): p. 215-219.
48. Masaoka, S., T. Ohe, and N. Sakota, *Production of cellulose from glucose by Acetobacter xylinum*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993. **75**(1): p. 18-22.
49. Ishihara, M.M., M.Hayashi, N.Tisler, V., *Utilization of d-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **31**(7): p. 986-991.

50. Ramana, K.V., A. Tomar, and L. Singh, *Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by Acetobacter xylinum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000. **16**(3): p. 245-248.
51. Nguyen, V.F., BernadineGidley, MichaelDykes, Gary, *Characterization of Cellulose Production by a Gluconacetobacter xylinus strain from Kombucha*. Current Microbiology, 2008. **57**(5): p. 449-453.
52. Mikkelsen, D.F., B. M.Dykes, G. A.Gidley, M. J., *Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus strain ATCC 53524*. Journal of Applied Microbiology, 2009. **107**(2): p. 576-583.
53. Pourramezan, G.Z., A.M. Roayaei, and Q.R. Qezelbash,, *Optimization of Culture Conditions for Bacterial Cellulose Production by Acetobacter sp. 4B-2*. Biotechnology 2009. **1**: p. 150-154.
54. Kim, S.-Y., Jin-NamWee, Young-JungPark, Don-HeeRyu, Hwa-Won, *Production of Bacterial Cellulose by Gluconacetobacter sp. RKY5 Isolated From Persimmon Vinegar Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, J.D. McMillan, et al., Editors. 2006, Humana Press. p. 705-715.
55. Jagannath, A.K., A.Manjunatha, S. S.Raju, P. S.Bawa, A. S., *The effect of pH, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (Nata-de-coco) by Acetobacter xylinum*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008. **24**(11): p. 2593-2599.
56. Kongruang, S., *Bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum strains from agricultural waste products*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008. **148**(1-3): p. 245-256.
57. Kurosumi, A.S., C.Yamashita, Y.Nakamura, Y., *Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by Acetobacter xylinum NBRC 13693*. Carbohydrate Polymers, 2009. **76**(2): p. 333-335.
58. Thompson, D.N. and M.A. Hamilton, *Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001. **91-3**: p. 503-513.
59. Premjet, S., D. Premjet, and Y. Ohtani, *The effect of ingredients of sugar cane molasses on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum ATCC 10245*. Sen-I Gakkaishi, 2007. **63**(8): p. 193-199.
60. Ha, J.H.S., O. Khan, S. Lee, S. Y. Park, J. W. Khan, T. Park, J. K., *Production of bacterial cellulose by a static cultivation using the waste from beer culture broth*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2008. **25**(4): p. 812-815.
61. [http://www.resolve.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=49&Itemid=56&lang=pt](http://www.resolve.com/index.php?option=com_content&view=article&id=49&Itemid=56&lang=pt). consultado em 11 de Agosto de 2011.
62. <http://www.marketeer.pt/2010/09/09/azeite-um-mercado-em-expansao/>. consultado em 11 de Agosto de 2011.
63. Tokimoto, T., NaohitoNakamura, TakeoAkutagawa, JyunichiTanada, Seiki, *Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass*. Journal of Colloid and Interface Science, 2005. **281**(1): p. 56-61.
64. Simões, J., Madureira, P., Nunes, F. M., do Rosário Domingues, M., Vilanova, M. and Coimbra, M. A. , *Immunostimulatory properties of coffee mannans*. Molecular Nutrition & Food Research, **53**: 1036–1043, 2009.
65. Kondamudi, N., S.K. Mohapatra, and M. Misra, *Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(24): p. 11757-11760.

66. Franca, A.S., L.S. Oliveira, and M.E. Ferreira, *Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds*. Desalination, 2009. **249**(1): p. 267-272.
67. Leifa, F., Pandey, A. and Soccol, C. R., *Solid state cultivation — an efficient method to use toxic agro-industrial residues*. Journal of Basic Microbiology, **40**: 187–197, 2000.
68. Villaverde, J.J., JiebingLigero, PabloEk, Monicade Vega, Alberto, *Mild peroxyformic acid fractionation of Miscanthus × giganteus bark. Behaviour and structural characterization of lignin*. Industrial Crops and Products, 2012. **35**(1): p. 261-268.
69. Hutchens, S., León, R., O'Neill, H. and Evans, B, *Statistical analysis of optimal culture conditions for Gluconacetobacter hansenii cellulose production*. Letters in Applied Microbiology, 44: 175–180, 2007.
70. Carreira, P., Joana A. S.Trovatti, ElianeSerafim, Luísa S.Freire, Carmen S. R.Silvestre, Armando J. D.Netto, Carlos Pascoal, *Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose*. Bioresource Technology, 2011. **102**(15): p. 7354-7360.
71. Ingrid H. Franke, M.F., Chris Hayward, Graham Leonard, Erko Stackebrandt and Lindsay I. Sly, *Description of Gluconacetobacter sacchari sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999. **49**, **1681-1693**.
72. Adriano-Anaya, M.S.-F., M. Ocampo, J. A. Garcia-Romera, I., *Plant cell-wall degrading hydrolytic enzymes of Gluconacetobacter diazotrophicus*. SYMBIOSIS, 2005. **40**; **151-156**
73. Marton, J.M.F., M. G. A.; SILVA, J. B. A. E.; PESSOA JÚNIOR, A., *Avaliação de carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando planejamento de experimentos*. Analytica, 2003. **3**, p. **45-54**.
74. Mussatto, S.I.C., Livia M.Silva, João P. A.Roberto, Inês C.Teixeira, José A., *A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds*. Carbohydrate Polymers, 2011. **83**(2): p. 368-374.